

Curto período de exposição ao chumbo promove aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, via receptores AT_2 , e ativação de canais para K^+ em aorta de ratos.

Jonaina Fiorim Pereira

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, abril de 2015**

Curto período de exposição ao chumbo promove aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, via receptores AT₂, e ativação de canais para K⁺ em aorta de ratos.

Jonaina Fiorim Pereira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 10/04/2015 por:

Prof^o. Dr^o Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES

Prof^a Dr^a Alessandra Simão Padilha- Co-orientadora - UFES

Prof^a Dr^a María Jesus Alonso – URJC

Prof^a. Dr^a Nazaré Souza Bissoli - UFES

Prof^o. Dr^o Fausto Edmundo Lima Pereira - UFES

Coordenadora do PPGCF: Prof^a. Dr^a Ivanita Stefanon

Fiorim, Jonaina 1981

Curto período de exposição ao chumbo promove aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, via receptores AT_2 , e ativação de canais para K^+ em aorta de ratos. [Vitória] 2015.

133p., 29,7cm (UFES, D. SC., Ciências Fisiológicas, 2015)

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Dalton Valentim Vassallo

1. Chumbo 2. Reatividade Vascular 3. Óxido Nítrico 4. Canais para K^+ 5.

Receptores de angiotensina do subtipo AT_2 .

Aos que eu mais amo, àqueles a quem eu devo tudo o que eu sou e tudo o que eu acredito. Meus pais (José e Waldete), irmãos (Ni e Rafa) e ao meu esposo (Marcelo).

Sem sonhos a vida não tem brilho
Sem metas, os sonhos não têm alicerces
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades
e corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir.

Augusto Cury.

AGRADECIMENTOS

A Deus por providenciar todas minhas necessidades e iluminar meu o caminho.

Ao meu pai José e minha mãe Waldete que são minha referência de vida. Obrigada por abdicarem de seus sonhos em função de minhas necessidades. Amo vocês!

Ao Marcelo e aos meus irmãos (Ni e Rafa) por estarem sempre ao meu lado. Obrigada pelo amor, paciência, presença e pelos muitos momentos de alegria. É maravilhoso tê-los em minha vida!

Ao Prof. Dr. Dalton, grande mestre da Ciência, agradeço pela oportunidade de conhecer o mundo da pesquisa e por compartilhar comigo seu extenso conhecimento. Ao querido “Chefe” agradeço por toda humanidade oferecida ao longo desses anos. Obrigada pelo seu apoio, conselhos, momentos de alegrias e principalmente pelas muitas vezes que me recebeu na sua sala quando eu precisei chorar.

À Prof^a. Dr^a. Alessandra por sua dedicação e por sua paciência. Obrigada por sempre me acolher nos momentos de dúvidas e me direcionar com boas idéias.

Ao Prof^o. Dr^o. Leonardo por toda sua disponibilidade nas discussões dos meus dados e pelos trabalhos desenvolvidos durante meu doutorado.

Aos professores do nosso laboratório: Prof^a. Dr^a Ivanita, Prof^a. Dr^a. Alessandra, Prof^o. Dr^o. Leonardo e Prof^a. Dr^a Paula Frizera obrigada por todo apoio, ensinamentos e opiniões. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento.

A Maria Jesus Alonso por toda sua disponibilidade nas discussões dos meus dados e correção dos artigos científicos.

As amigas Maylla e Camila pela ajuda experimental com o DAF.

Aos amigos do LEMC: Aurélia, Camila, Carol, Cindy, David, Dieli, Edna, Emilia, Emily, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Gilson, Karol, Kelly, Marito, Paula, Renata, Rogério, Sâmia, Teca, Tati, Thaís, Thiago e Vinícius.

As minhas amigas Bruna e Maylla, que embarcaram comigo nesta caminhada cheia de desafios e descobertas. Obrigada pelos ótimos momentos compartilhados e por estarem sempre ao meu lado.

Ao Rogério por suas “boas idéias” e disponibilidade em todos os momentos que procurei sua ajuda.

As amigas Ludimila e Rebeca pela amizade e convívio.

À adorável Rose, sempre gentil e atenciosa comigo! Obrigada por toda sua dedicação, sua preocupação e humanidade!

Aos amigos do HUCAM e do HEIMABA obrigada pelo apoio, força e torcida.

À todos os queridos companheiros do PPGCF / UFES, pela amizade e companhia dentro e fora da universidade.

À todos os demais professores do PPGCF / UFES, pela contribuição em minha formação.

À todos os funcionários do PPGCF / UFES, pelos serviços prestados.

À CAPES, CNPq e à FAPES/FUNCITEC, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	CHUMBO.....	27
1.1.1	História do Chumbo.....	27
1.1.2	Características do metal.....	28
1.1.3	Fontes Naturais do Chumbo.....	28
1.1.4	Fontes Antropogênicas.....	29
1.1.4.1	Produção e Consumo Mundial.....	29
1.1.4.2	Formas de exposição ao chumbo.....	30
1.1.5	Cinética do Chumbo no Organismo Humano.....	31
1.1.5.1	Absorção.....	32
1.1.5.2	Distribuição.....	32
1.1.5.3	Eliminação.....	33
1.1.6	Efeito do chumbo nos diferentes sistemas	33
1.1.6.1	Efeitos Cardiovasculares.....	35
1.2	MÚSCULO LISO VASCULAR.....	36
1.3	ENDOTÉLIO VASCULAR.....	37
1.4	ÓXIDO NÍTRICO.....	39
1.5	CANAIS PARA POTÁSSIO.....	42
1.5.1	Subtipos de Canais para Potássio.....	43
1.5.1.1	Canais para K^+ Voltagem dependentes (K_v).....	43
1.5.1.2	Canais para K^+ dependentes de Cálcio (K_{Ca}).....	44
1.5.1.2.1	<i>Canais para K^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}).....</i>	<i>44</i>
1.5.1.2.2	<i>Canais para K^+ ativados por cálcio de Baixa condutância (SK_{Ca}) e intermediária condutância (IK_{Ca}).....</i>	<i>47</i>
1.5.1.3	Canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}).....	48
1.5.1.4	Canais para K^+ retificadores de influxo (K_{IR}).....	49
1.6	RECEPTOR DA ANGIOTENSINA II DO SUBTIPO AT_2	50
2	JUSTIFICATIVA.....	53
3	OBJETIVOS.....	55
3.1	OBJETIVO GERAL.....	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	56

4.1.1	Modelo Experimental.....	56
4.2	METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA.....	57
4.2.1	Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl).....	59
4.2.2	Avaliação da integridade funcional do endotélio.....	60
4.3	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	61
4.3.1	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	61
4.3.2	Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	61
4.3.2.1	Influência do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.....	62
4.3.2.2	Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT ₂ na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	62
4.3.3	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento dependente do endotélio.....	63
4.3.3.1	Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a atividade funcional dos canais para potássio na resposta de relaxamento dependente do endotélio.....	63
4.3.3.2	Influência do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica pré-contráida com fenilefrina ou com KCl (60 mmol/L).....	64
4.3.3.3	Influência dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o tônus basal e a resposta de relaxamento dependente do endotélio.....	64
4.3.4	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento independente do endotélio.....	64
4.3.4.1	Influência dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento independente do endotélio.....	65
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A MEDIDA DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO NOS	

	ANÉIS DE AORTA TORÁCICA.....	65
4.5	EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
4.6	FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	67
5	RESULTADOS.....	69
5.1	VALORES DE MASSA CORPORAL.....	69
5.2	RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA.....	69
5.3	EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.....	70
5.3.1	Efeito dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina nos aorta torácica.....	71
5.3.1.1	Participação do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.....	71
5.3.1.2	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT ₂	73
5.3.2	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta torácica.....	77
5.4	EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	78
5.4.1	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a atividade funcional dos canais para potássio nos anéis isolados de aorta.....	79
5.4.1.1	Participação do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica pré- contraída com fenilefrina ou com KCl (60 mmol/L).....	80
5.4.1.2	Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o tônus basal e o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica.....	82
5.5	EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO	

	ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	86
5.5.1	Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aorta torácica.....	88
6	DISCUSSÃO.....	90
6.1	CHUMBO: FATOR DE RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	90
6.2	EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.....	91
6.2.1	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a modulação endotelial.....	93
6.2.2	Efeito dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.....	94
6.2.2.1	Participação do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.....	94
6.2.2.2	Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT ₂	96
6.3	EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	98
6.3.1	Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o tônus basal e o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica.....	101
6.4	EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	105
6.4.1	Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aorta torácica.....	105
6.5	SUMARIAÇÃO DOS RESULTADOS.....	107
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....109
	ANEXO I:.....124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de ratos Wistar dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb).....69

Tabela 2: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo.....70

Tabela 3: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo , na presença e na ausência de L-NAME.....72

Tabela 4: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo, na presença e na ausência de PD12331.....74

Tabela 5: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo, na presença e na ausência de L-NAME + PD 123319.....75

Tabela 6: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com à fenilefrina.....78

Tabela 7: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com KCl (60 mmol/L).....79

Tabela 8: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), na presença e na ausência de L-NAME. A resposta máxima está expressa

como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina ou com KCl (60 mmol/L).....81

Tabela 9: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), na presença e na ausência de TEA, 4-AP, IbTx e Apamina. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina.....84

Tabela 10: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.....87

Tabela 11: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), na presença e na ausência de IbTx e 4-AP. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.....88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura I: Fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. 20-HETE, o ácido 20-hidroxieicosatetraenóico; K_{Ca} , canais para potássio ativados por cálcio; COX, ciclooxigenase; LOX, lipooxigenase; EC, células endoteliais; EDCFs, fatores vasoconstritores derivados do endotélio; EDRFs, fatores vasodilatadores derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; NOS, óxido nítrico; H_2O_2 , o peróxido de hidrogénio; NOX, NAD(P)H-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI₂, prostaciclina; PGs, prostaglandinas; ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido-dismutase; ET-1, endotelina; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase, H_2S , sulfeto de hidrogênio. Fonte: Félétou e Vanhoutte, 2009.....38

Figura II: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular (Rattmann, 2009).....39

Figura III: Via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS. Esta via pode ser ativada após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, este mediador exerce sua ação nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiro, GMPc, ou ainda através da hiperpolarização (modificado de Rattmann, 2009).41

Figura IV: Distribuição espacial e funcional dos canais para potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}). Os três subtipos de K_{Ca} , os BK_{Ca} , IK_{Ca} e canais SK_{Ca} , estão presentes na parede vascular, mas com a localização muito específica. Os BK_{Ca} são expressos no MLV, próximos ao retículo endoplasmático. Os IK_{Ca} e SK_{Ca} (especialmente a subunidade α SK3) são constitutivamente expressas em células

endoteliais. Os SK_{Ca} estão difusamente distribuídos nas junções endoteliais, especialmente na região das cavéolas, e estão associados com várias conexinas (Cxs). Os IKCa são preferencialmente localizadas nas junções mioendoteliais. ACh, a acetilcolina; BK, bradicinina; PE, fenilefrina; RyR, receptor ryanodine; SP, substância P; Na⁺ / K⁺ -ATPase e canais para potássio retificadores de influxo (K_{IR}) (Fonte: Félétou e Vanhoutte, 2009).....46

Figura V: Vasodilatação induzida pelo receptor AT₂, mediada pela ativação da cascata bradicinina, NO e GMPc. A estimulação dos receptores AT₂ aumentam produção local de bradicinina em vasos, que por sua vez, estimula receptores B₂ para ativar a cascata NO / cGMP. Bradicininina (BK), receptor de bradicininina 2 (BK B₂), Calicreína, CGs (guanilato ciclase solúvel), monofosfato cíclico de guanossina (GMPc), trifosfato de guanossina (GTP) (Shetal e Carey., 2013).....52

Figura VI: Modelo Experimental utilizado no presente estudo. Os ratos foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Chumbo. Os animais do grupo Chumbo receberam diariamente, durante sete dias, injeções intramusculares (im.) de acetato de chumbo, enquanto os animais do grupo Controle receberam diariamente injeção im. de solução salina (O Estado de São Paulo, 2011).....57

Figura VII: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 4 mm (Angeli, 2009).....58

Figura VIII: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*” (Nunes, 2014).....59

Figura IX: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 1µM; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10µM. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2011).....60

Figura X: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (0,1 nM – 0,3 mM) (Angeli, 2009).....62

Figura 1: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos Controle (Ct) e Chumbo (Pb). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. *p< 0,05 para R_{máx}: Ct vs Pb.....71

Figura 2: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (Ct) e após a incubação com L-NAME (L-NAME Ct); (B) Chumbo (Pb) e após a incubação com L-NAME (L-NAME Pb); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle (não-preenchido) e Chumbo (preenchido). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t não-pareado. #p< 0,05 para Ct vs Ct L-NAME; *p< 0,05 para pD₂ e R_{máx}= Pbvs Pb L-NAME - e % dAUC - Ct vs Pb.....73

Figura 3: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (Ct) e após a incubação com PD123319 (Ct); (B) Chumbo (Pb) e após a incubação com PD123319 (Pb PD123319); O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não-pareado. $p > 0,05$ para $R_{\text{máx}}$ e pD_2 : Ct vs Ct PD123319; $*p < 0,05$ $R_{\text{máx}}$: Pb vs Pb PD123319.....75

Figura 4: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (Ct) e após a incubação com L-NAME + PD 123319 (Ct + L-NAME + PD123319); (B) Chumbo (Pb) e após a incubação com L-NAME + PD 123319 (Pb L-NAME + PD 123319); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle (não-preenchido e pontilhado) e Chumbo (preenchido e cinza). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não-pareado. $^{\#}p < 0,05$ para Ct vs Ct L-NAME + PD123319; $*p < 0,05$ para pD_2 e $R_{\text{máx}}$ = Pb E⁺ vs Pb L-NAME + PD 123319 - e % dAUC, Anova 1 via. $^*p < 0,05$ para Ct L-NAME vs Pb L-NAME; $^{\#}p < 0,05$ para Pb L-NAME VS Pb L-NAME + PD123319.....76

Figura 5: Liberação local de óxido nítrico (NO) na condição basal e estimulada com o uso de 5-diaminofluoresceína (DAF), em anéis de aorta de ratos controle (Ct; n=7, não preenchido) e tratados com acetate de chumbo (Pb; n=7; preenchidos). Os resultados, média \pm EPM, estão expressos em unidades arbitrárias/mg de tecido, calculados a partir da intensidade de fluorescência emitida pelo DAF. Anova 1 via. $^*P < 0,05$ Ct vs Pb; $^{\#}P < 0,05$ Ct vs Pb L-NAME e $^{\&}P < 0,05$ Pb vs Pb PD.....77

Figura 6: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t não-pareado. $p > 0,05$78

Figura 7: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), pré-contraídos com KCl (60mmol/L). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção KCl (60mmol/L). Teste *t* não-pareado. * $p \leq 0,05$ R_{máx}: Ct vs Pb.....80

Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e após a incubação com L-NAME (Ct L-NAME); e Chumbo (Pb) e após a incubação com L-NAME (Pb L-NAME), pré-contraídos com fenilefrina (A,B) e com KCl (60mmol/L) (C,D). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção KCl (60mmol/L). Teste *t* não-pareado. # $p \leq 0,05$ R_{máx}: Ct vs Ct L-NAME; * $p \leq 0,05$ R_{máx}: Pb vs Pb L-NAME.....82

Figura 9: Influência dos canais para potássio sobre o tônus basal (A) e curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct - não preenchido) e após a incubação com TEA (Ct TEA) (B) e 4-AP (Ct 4-AP) (E); e Chumbo (Pb - preenchido) e após a incubação com TEA (Pb TEA)(C) e 4-AP (Pb 4-AP) (F). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste *t* não-pareado. # $p \leq 0,05$ R_{máx}: Ct vs Ct TEA; Ct vs Ct 4-AP; * $p \leq 0,05$ R_{máx}: Pb vs Pb TEA; Pb vs Pb 4-AP. % dAUC, Teste *t*. * $p < 0,05$ para Ct vs Pb (D, G).....85

Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e após a incubação com IbTX (Ct IbTX) (A) e Apamina (Ct AP) (D); e Chumbo (Pb) e após a incubação com IbTX (Pb IbTX)(B) e Apamina (Pb AP) (E). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste *t* não-pareado. # $p \leq 0,05$ R_{máx}: Ct vs Ct IbTX; Ct vs Ct Apamina; * $p \leq 0,05$ R_{máx}: Pb vs Pb IbTX; Pb vs Pb Apamina. % dAUC, Teste *t*. * $p < 0,05$ para Ct vs Pb (C, F).....86

Figura 11: Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste *t* não-pareado. $p > 0,05$87

Figura 12: Curvas concentração-resposta ao NPS em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e após a incubação com IbTX (Ct IbTX) (A) e 4-AP (Ct 4-AP) (D); e Chumbo (Pb) e após a incubação com IbTX (Pb IbTX)(B) e 4-AP (Pb 4-AP) (E). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste *t* não-pareado. [#]*p* ≤ 0,05 R_{máx}: Ct vs Ct 4-AP; ^{*}*p* ≤ 0,05 R_{máx}: Pb vs Pb IbTX; Pb vs Pb 4-AP. % dAUC, Teste *t*. ^{*}*p* < 0,05 para Ct vs Pb (C, F).....89

Figura 13: Sumariação esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. O tratamento i.m. com acetato de chumbo aumentou a PAS e a ECA plasmática (Fiorim *et al.*, 2011). Os níveis elevados da ECA plasmática poderia aumentar a Angio II. A interação da angiotensina II com o receptor AT₂ está relacionada com a liberação de NO promovendo vasodilatação (Shetal *et al.*, 2013). O presente estudo mostrou envolvimento dos receptores AT₂ no aumento de biodisponibilidade de NO. Além disso, sabendo que o NO induz a vasodilatação através de diferentes vias, incluindo a ativação de canais para K⁺ (Bolotina *et al.*, 1994; Féletou e Vanhoutte, 2006), nossos resultados sugerem maior participação dos canais Kv, BK_{Ca} e SK_{Ca} no o controle do tônus vascular.....107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,4,5 – inositol trifosfato (IP_3)

3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

5 Hydroxytryptamine (5-HT)

5'-trifosfato de adenosina (ATP)

Ácido δ -amino levulínico (ALAD)

Ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)

Ácido 20-hidroxieicosatetraenóico (20-HETE)

Acetilcolina (ACh)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Adenosina difosfato (ADP)

Adenosina trifosfato (ATP)

Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA)

Agencia de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR)

4-aminopiridina (4-AP)

Ânion superóxido (O_2^-)

Áreas abaixo da curva (AUC)

Apocinina (Apo)

Bradicinina (BK),

Bomba de Ca^{+2} sensível ao ATP (Ca^{+2} ATPase)

Bomba sódio-potássio sensível ao ATP (NKA)

Canais para K^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca})

Canais de K^+ ativados por cálcio de intermediária (IK_{Ca})

Canais de K^+ ativados por cálcio de baixa condutância (SK_{Ca})

Canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} (K_{Ca})

Canais de K^+ retificador de influxo (K_{ir})

Canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Canais de K^+ voltagem dependentes (K_v)

Células endoteliais (EC)

Células do músculo liso vascular (VSMC)

Ciclooxigenase (COX)

Cloreto de potássio (KCl)

Cloreto de polivinila (PVC)

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES)

Companhia Brasileira de Chumbo (Cobrac)

Conexinas (Cxs)

Concentração intracelular de Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_{cit}$)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES)

Débito cardíaco (DC)

Diacylglicerol (DAG)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC)

Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM)

Endotelina (ET)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Enzima conversora da angiotensina do tipo II (ECA II)

Enzima fosfolipase A₂ (PLA₂)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fatores vasoconstritores derivados do endotélio (EDCFs)

Fatores vasodilatadores derivados do endotélio (EDRFs)

Fenilefrina (FE)

Fosfatidilinositol bifostato (PIP₂)

Guanilato ciclase solúvel (CGs)

Grupo Chumbo (Pb)

Grupo Controle (Ct)

Graus Celsius (°C)

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Iberiotoxina (IbTx)

International Lead Zinc Study Group (ILZSG)

Inibidor não-seletivo da NOS, o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Intraperitonal (*i.p*)

Intramuscular (*i.p*)

Imunoglobulina E (IgE)

Íon chumbo (Pb⁺²)

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

Lipooxigenase (LOX)

Malondialdeído (MDA)

Molar (M)

Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

Músculo liso vascular (MLV)

Nitroprussiato de sódio (NPS).

Norma Regulamentadora nº 7 do Ministério do Trabalho (NR7)

Organização Mundial de Saúde (WHO)

Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Pressão arterial (PA)

Pressão arterial sistólica (PAS)

Pressão arterial diastólica (PAD)

Partículas por milhão (ppm)

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2),

Potencial de membrana (Pm)

Prostaciclina (PGI_2)

Prostaglandinas H_2 (PGH_2)

Prostaglandinas $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)

Proteína quinase A (PKA)

Proteína quinase dependente de AMPc (AMPK)

Proteína quinase G (PKG)

Proteína serina treonina (AKt)

Quinase II dependente da calmodulina (CaMK II)

Radical sufidril (-SH)

Receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT_1)

Receptor de angiotensina do subtipo 2 (AT_2)

Receptor de bradicinina 2 (BK B_2)

Receptor muscarínico (M2)

Receptor de rianodina (RyR)

Resistência vascular periférica (RVP)

Resposta máxima (R_{máx})

Retículo sarcoplasmático (RS)

Sensibilidade (pD₂)

Serina (Ser)

Serina treonina quinase (Akt)

Sintase da prostaglandina H (PGHS)

Sistema nervoso central (SNC)

Sistema nervoso periférico (SNP)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

Sociedade Americana de Pediatria (APA)

Substância P (SP)

Superóxido dismutase (SOD)

Tetraetilamônio (TEA)

Tetrahidropterina (BH₄)

Treonina (Thr)

Trifosfato de guanosina (GTP)

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

RESUMO

O chumbo tem sido identificado como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. De fato, estudo prévio mostrou que sete dias de exposição ao chumbo aumentou a pressão arterial sistólica (PAS), diminuiu a reatividade vascular e aumentou a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) em aortas de ratos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o envolvimento dos receptores AT_2 no aumento da biodisponibilidade de NO e a participação dos canais para K^+ em aorta de ratos expostos ao chumbo. Ratos Wistar foram tratados com acetato de chumbo por sete dias (1ª dose 4 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e doses subsequentes de 0,55 $\mu\text{g}/100\text{g im}$) ou veículo. O tratamento com acetato de chumbo reduziu a resposta contrátil à fenilefrina (FE 0,1 nM – 0,3 mM) e não modificou a resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh, 0.1 nM - 300 μM) e ao nitroprussiato de sódio (NPS, 0.01 nM - 0.3 μM) em aorta de ratos. O L-NAME (100 μM) aumentou a resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina em ambos os grupos, mas este efeito foi maior no grupo chumbo. A incubação com PD 123319 (1 μM), inibidor específico dos receptores AT_2 , aumentou a resposta vasoconstrictora induzida pela FE somente em aortas de ratos tratados com chumbo. A co-incubação PD 123319 (1 μM) e L-NAME (100 μM) aumentou a resposta contrátil à FE nas artérias de ambos os grupos e este efeito foi similar nos grupos controle e chumbo. Quando os anéis de aorta foram pré-incubados com KCl (60 mM/L) ou incubados com TEA (2 mM), 4-aminopiridina (4-AP, 5 mM), iberiotoxina (IbT_x , 30 nM) e apamina (0.5 μM) o relaxamento induzido pela ACh foi menor nos animais chumbo. Além disso, após incubação com a 4-AP e a IbT_x o relaxamento induzido pelo NPS foi menor nos ratos tratados com chumbo. Em adição, houve maior liberação local de NO no grupo chumbo. A presença de L-NAME e PD 123319 normalizou a liberação local de NO nos animais tratados com chumbo. Em suma, os resultados do presente estudo sugerem o envolvimento dos receptores AT_2 no aumento de biodisponibilidade de NO nos animais chumbo. Como consequência, esse metal promoveu a ativação de canais para K^+ e esse efeito poderia ser um mecanismo compensatório ao aumento da PAS.

Palavras-chave: chumbo, reatividade vascular, óxido nítrico, canais de potássio e receptores AT_2 .

ABSTRACT

Lead has been reported as a hazard and risk factor for developing cardiovascular diseases. Indeed, previous study showed that seven days of lead exposure increased systolic blood pressure (SBP), decreased vascular reactivity and increased nitric oxide (NO) bioavailability in rat aortas. Thus, the aim of this study was to evaluate the involvement of AT₂ receptors in the increased bioavailability of NO and the participation of K⁺ channels in aortas from lead-treated rats. Wistar rats were treated with lead (1st dose 4 µg/100 g, subsequent doses 0.05 µg/100 g, im, 7 days) or vehicle. Lead treatment reduced the contractile response of aortic rings to phenylephrine (PHE, 0.1 nM – 0.3 mM) without changing the vasodilator response to acetylcholine (ACh, 0.1 nM - 300 µM) or sodium nitroprusside (SNP, 0.01 nM - 0.3 µM). Incubation with L-NAME (100 mM) increased the vasoconstrictive response induced by phenylephrine in both groups, but this effect was greater in the aortas from the treated group. Incubation with PD 123319 (1 µM), an AT₂ receptor specific inhibitor, increased the vasoconstrictor response induced by phenylephrine only in aortas from the treated group. Co-incubation PD 123319 (1 mM) and L-NAME (100 mM) increased the contractile response to phenylephrine in the arteries of both groups and this effect was similar in the aortas from the treated and untreated rats. When aortic rings were precontracted with KCl (60 mM/L) or preincubated with TEA (2 mM), 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM), iberiotoxin (IbTX, 30 nM), apamin (0.5 µM) or charybdotoxin (0.1 µM), the ACh-induced relaxation was more reduced in the lead-treated rats. Additionally, 4-AP and IbTX reduced more the relaxation elicited by SNP in the lead-treated rats. In addition, there was greater local release of NO in the lead-treated rats. The presence of L-NAME, and PD123319 normalized local release of NO in lead-treated rats. In summary, the present results suggest the involvement of AT₂ receptors in increasing the bioavailability of NO in lead-treated rats. As a consequence the metal promoted activation channels for K⁺ and this effect could be a compensatory mechanism against the increase in SBP.

Keywords: Lead, vascular reactivity, nitric oxide, potassium channels and AT₂ receptors

1 INTRODUÇÃO

1.1 CHUMBO

1.1.1 História do Chumbo

O chumbo foi um dos primeiros metais a ser trabalhado pelo homem, sendo conhecido desde 3500 a.C., de acordo com as descobertas arqueológicas feitas no Egito. Existem relatos que a civilização egípcia utilizava o chumbo na cunhagem de moedas e fabricação de cosméticos. Durante o Império Romano esse metal foi amplamente utilizado na fabricação de canos para o sistema de esgoto; armas e utensílios domésticos como copos, taças e recipientes para líquidos e alimentos; além de aquedutos e reservatórios para fermentação e acondicionamento de bebidas alcoólicas (Capitani *et al.*, 2009).

No Brasil, a produção de chumbo metálico foi marcante até a década de 90 devido à existência de duas grandes fundições primárias utilizadas no refino do minério extraído na Bahia e no Paraná. Desde então sua produção tem sofrido declínio e em 2012 a produção brasileira representou 0,2% da produção mundial desse metal (Capitani *et al.*, 2009; Brasil, 2013).

Como o chumbo é utilizado por tão longo tempo, a história da intoxicação por este metal também é extensa. Hipócrates, no século V a.C., foi o primeiro a relacionar os sintomas da intoxicação do chumbo ao seu fator causal, (Moraes, 2014). Outros relatos de intoxicação ocupacional foram pronunciados na Inglaterra em 1883 por trabalhadores que utilizavam o metal como matéria prima (Stephan, 2007).

A intoxicação pelo chumbo causa uma das mais antigas doenças ocupacionais, chamada Saturnismo ou Plumbismo. O termo saturnismo é uma referência ao Deus Saturno, idolatrado na Roma Antiga. Assim, os efeitos neurológicos da intoxicação por esse metal foram primeiramente descritos no império romano (Stephan, 2007). Atualmente, os avanços experimentais em modelos animais e populacionais permitiram maior conhecimento sobre o efeito tóxico do chumbo. Todavia, é necessário o desenvolvimento de pesquisas na área da toxicologia não só para ampliar o conhecimento dos efeitos tóxicos, mas também

para elaboração de medidas preventivas e descobertas de possíveis tratamentos a serem utilizados em casos de intoxicação por esse metal.

1.1.2 Características do metal

O chumbo é um metal cinza-azulado, inodoro e maleável. Pertence ao grupo IV B da tabela periódica, é representado pelo símbolo Pb, possui número atômico 82 e massa atômica 207 u. Encontra-se em estado sólido à temperatura ambiente, se funde com facilidade a 327,4 °C com temperatura de vaporização a 1725 °C (IUPAC, 2003).

A utilização industrial do chumbo pode ser explicada por possuir algumas características como: baixo ponto de fusão, alta ductibilidade, facilidade de formar liga, razoável condutor de calor e eletricidade e condutibilidade térmica (Brasil, 2006). Sua elevada maleabilidade e flexibilidade favorecem a produção de chapas e de tubos, utilizados principalmente na construção civil. Além disso, esse metal possui a propriedade singular de absorver radiações de ondas curtas, o que o torna o isolante mais utilizado no emprego de raios-x (Brasil, 2009).

1.1.3 Fontes Naturais do Chumbo

O chumbo é considerado o quinto metal mais abundante do planeta (Matos, 2007). Suas maiores fontes naturais são as emissões vulcânicas, evaporação dos oceanos e degradação de rochas (WHO, 1995; Paoliello, 2001; Brasil, 2006). Esse metal pode ser encontrado na natureza tanto na forma livre como em associação com outros metais (Paoliello, 2001). O íon estável do chumbo é o Pb^{2+} e combinado com o enxofre forma a galena ($PbS = 86,6\%$ de Pb e $13,4\%$ de S) que é a principal fonte primária e comercial de chumbo. O chumbo ocorre ainda em outras variedades de minérios tais como a cerusita ($PbCO_3$) e a anglesita ($PbSO_4$) (Paoliello e Chasin, 2001).

Na atmosfera, o chumbo encontra-se na forma particulada. Essas partículas, quando lançadas no ar, podem ser removidas da atmosfera e transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição úmida ou seca. Entretanto,

Introdução

o teor de chumbo no solo é muito influenciado pelas atividades antropogênicas e pelo transporte do metal através do ar, oriundo de várias fontes (WHO, 1995; Paoliello e Chasin, 2001). Estima-se que a taxa de emissão de chumbo na atmosfera seja de aproximadamente 19.000 toneladas por ano, e que os níveis naturalmente presentes no solo seja de 10 a 70 mg/Kg (WHO, 1995).

1.1.4 Fontes Antropogênicas

1.1.4.1 Produção e Consumo Mundial

Além das fontes naturais, a emissão de chumbo ocorre também através de fontes antropogênicas. De acordo com o Departamento Nacional de Produção Mineral, em 2012, as reservas mundiais de chumbo atingiram 89 Mt. A produção mundial do minério concentrado alcançou um crescimento de 10,64% em relação a 2011. Os principais produtores de chumbo primário são os países detentores das maiores reservas do mundo: China, Austrália e Estados Unidos. Já a produção brasileira de chumbo metálico refinado foi de 165,40 Kt, correspondendo a 1,56% da produção global, colocando o Brasil na décima sexta posição entre os maiores produtores mundiais (Brasil, 2013).

A maior parte da produção brasileira de concentrado de chumbo é oriunda de Minas Gerais (Brasil, 2009; 2013), seguidos dos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Tocantins e Bahia (Brasil, 2009). O Brasil não possui produção primária de chumbo metálico refinado, a produção deste metal é obtida a partir de reciclagem de material usado, especialmente de baterias automotivas e indústrias de telecomunicações (Brasil, 2013). Estima-se que das 20 milhões de novas baterias automotivas fabricadas anualmente no Brasil, 95% delas sejam provenientes do processo de reciclagem do chumbo (Brasil, 2009).

O chumbo refinado é consumido com intensidade em todos os países em estágio avançado de industrialização. Atualmente a China é considerada o maior produtor e consumidor mundial do metal (Brasil, 2009). O consumo do metal no Brasil e no mundo ascende paralelamente à taxa de crescimento das economias de alguns países em desenvolvimento, como a China, Coréia do Sul e Índia que tem

incorporado um importante aumento na industrialização de veículos automotores, computadores, telefones celulares e eletroeletrônicos, refletindo no aumento progressivo da demanda do metal (Brasil, 2009).

O consumo do metal ocorrido no Brasil ao longo das últimas três décadas indica que o consumo que era da ordem de 100.000 toneladas/ano passou para o patamar de 220.000 toneladas/ano, crescimento favorecido principalmente pelo desenvolvimento da indústria automobilística (Brasil, 2009). No ano de 2012, 81,9% do chumbo metálico foi destinado aos fabricantes de baterias automotivas (Brasil, 2013). Outras indústrias como as de condutores elétricos destacam-se pela utilização de ligas de chumbo para a cobertura de cabos. Além disso, em menor proporção, o consumo do metal é efetuado pelas fábricas de tanques de armazenamento de substâncias corrosivas, de produção de munições e indústrias tipográficas (Moraes, 2014).

1.1.4.2 Formas de exposição do chumbo

Atualmente, no Brasil, calcula-se que cerca de 90% do consumo de chumbo metálico provenha de atividades de reciclagem. Os maiores consumidores de chumbo no país são as indústrias de baterias automotivas (80%), seguidos das indústrias de pigmentos com 12% e o setor eletro-eletrônico (solda e ligas) com 8% (Capitani *et al.*, 2009). As indústrias de reciclagem de chumbo são potencialmente poluidoras, devido à emissão de gases e particulados decorrentes do próprio processo de produção e reciclagem. Entretanto a reciclagem ainda é para o meio ambiente e economicamente mais viável que a extração (Matos, 2007).

As baterias são as principais fontes de chumbo secundário. Para o processo de recuperação do chumbo desses materiais, são utilizados alguns métodos que acabam liberando gases e particulados do metal para a atmosfera, gerando também resíduos em uma quantidade considerada altamente perigosa e que deveria ser disposta em aterro industrial adequado (Matos, 2007, Brasil, 2013).

Os sais de chumbo formam a base de muitas tintas e pigmentos, porém sua utilização é controlada por alguns países. No Brasil, em 2008 foi publicada a Lei nº 11.762, que regulariza o uso de pigmentos e secantes à base de chumbo em tintas

Introdução

imobiliárias. A lei estabelece que tintas imobiliárias não possa conter chumbo em concentração igual ou superior a 0,06%, em peso (Brasil, 2008).

A indústria química utiliza amplamente o chumbo. O carbonato de chumbo é empregado na síntese do cloreto de polivinila (PVC) (Capitani *et al.*, 2009), o arseniato de chumbo na fabricação de inseticida, o sulfato de chumbo na produção da borracha, o naftaleno de chumbo como secativo e o chumbo tetraetila como aditivo para gasolina (Paoliello e Chasin, 2001). No Brasil, a presença do chumbo na gasolina foi proibida desde 1978, no entanto alguns países ainda utilizam o metal na composição do combustível (Paoliello e Chasin, 2001).

Mediante as várias formas de exposição ao chumbo, em especial as ocupacionais, alguns países estabeleceram um nível máximo de chumbo no sangue, acima do qual o indivíduo pode ser afastado do ambiente de trabalho (Paoliello e Chasin, 2001). Nas décadas de 60 e 70 eram comuns níveis de limites máximos de 100 µg/dL. Atualmente, esses níveis foram reduzidos na faixa de 40 à 60 µg/dL em diferentes países (Mayer e Wilson, 1998).

A Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) recomenda ser segura uma concentração sanguínea de chumbo inferior 30 µg/dL em adultos. Em ambientes de exposição ocupacional os níveis de concentração sanguínea de chumbo não devem exceder 60 µg/dL. Já a Associação Americana de Pediatria (AAP) considera níveis de concentração sanguínea de chumbo ≥ 10 µg/dL excessivos para crianças.

No Brasil, de acordo com a norma regulamentadora nº 7 (NR7) do Ministério do Trabalho (1988), revisada em 2013, os valores de referência de normalidade, o qual representa o valor próximo de ser encontrado em uma população não-exposta ocupacionalmente e o Índice Biológico Máximo permitido, são respectivamente, de 40 µg/dL e 60 µg/dL (Brasil, 1988; 2013).

1.1.5 Cinética do Chumbo no Organismo Humano

Como descrito anteriormente, o chumbo é um metal amplamente utilizado há milhares de anos. É considerado um contaminante ambiental, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua distribuição. Sendo assim, todos os

indivíduos possuem chumbo em seus organismos como resultado da exposição a fontes exógenas. A fim de correlacionar a quantidade de chumbo ambiental e a sua biodisponibilidade com seus efeitos tóxicos no organismo, é importante compreender a interação contínua entre a absorção, distribuição, armazenamento e eliminação deste metal (Moreira e Moreira, 2004).

1.1.5.1 Absorção

O processo de absorção do chumbo proveniente de fontes ambientais depende da quantidade de metal, do seu estado físico e químico, além de ser influenciado por fatores relacionados ao hospedeiro (idade, genética, estado fisiológico) e condições nutricionais (Paoliello, 2001). A maior parte do chumbo entra no organismo humano pelo trato respiratório e gastrointestinal e, somente em sua forma orgânica, pode penetrar no organismo por via cutânea (Brasil, 2006; Moraes, 2014). O trato respiratório é a principal via de absorção do chumbo na exposição ocupacional (Paoliello e Chasin, 2001).

1.1.5.2 Distribuição

Algumas hipóteses de distribuição cinética do chumbo têm sido apresentadas há algumas décadas pela comunidade científica. Uma das principais idéias se baseia no modelo de distribuição em três compartimentos: sangue, tecidos moles e tecidos mineralizados (Rabinowitz *et al.*, 1976; ATSDR, 1995; Paoliello e Chasin, 2001). A meia-vida desse metal nos três compartimentos é bastante diferente, sendo estimada em 36 dias para o sangue, 40 dias para os tecidos moles e 27 anos para os ossos (Rabinowitz *et al.*, 1976; WHO, 1995).

A concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo (Goyer, 1991). O metal presente no sangue é distribuído entre os órgãos, dependendo principalmente da afinidade pelo tecido específico. Níveis elevados têm sido encontrados na aorta, fígado e rins. A retenção do chumbo nos tecidos moles se estabiliza na vida adulta e pode decrescer em alguns órgãos com a idade,

Introdução

contudo continua a se acumular nos ossos e na aorta durante toda a vida (Saryan e Zenz, 1994; Moraes, 2014).

Em adultos, aproximadamente 95% da carga corpórea do chumbo encontra-se nos ossos, visto que esse metal é um análogo biológico do cálcio, seu sítio primário de deposição é o tecido ósseo. Em face da meia vida longa para o chumbo nos ossos, esse compartimento serve como fonte endógena do metal para outros compartimentos, muito tempo depois de cessada a exposição (Moreira e Moreira, 2004; WHO, 1995). A mobilização desse cátion para compartimentos sanguíneos, em mulheres grávidas, é de grande importância e constitui um risco para o feto e para mãe (WHO, 1995).

1.1.5.3 Eliminação

A eliminação do chumbo no organismo humano é lenta, com meia vida é de aproximadamente 10 anos (Moraes, 2014). Esse metal é excretado por diferentes vias, entre as quais, incluem-se: a excreção renal (75-80%) e a gastrointestinal (15%). Existem outras fontes de excreção que somadas correspondem 8%, são elas: suor, descamação cutânea, cabelo, as unhas e o leite materno (Tsalev e Zaprianov, 1985; Paoliello e Chasin, 2001; Moreira, 2014).

Compreendidas a cinética e toxicologia do chumbo, uma abordagem acerca dos efeitos tóxicos desse metal nos diferentes sistemas do organismo far-se-à necessária.

1.1.6 Efeito do Chumbo nos diferentes sistemas

O chumbo caracteriza-se por ser um metal tóxico cumulativo que afeta vários sistemas do corpo, incluindo principalmente neurológico, hematológico, gastrointestinal, renal e cardiovascular (WHO, 2010), não havendo evidências de funções fisiológicas no organismo (Moreira e Moreira, 2004).

Os mecanismos de toxicidade propostos envolvem vários processos bioquímicos, principalmente os que estão relacionados ao funcionamento de

membranas celulares e enzimas. As alterações no funcionamento de enzimas estão principalmente relacionadas às interações desse metal com os grupamentos sulfidril (-SH) de proteínas que estão intimamente relacionadas a ativação de proteínas quinases C, fazendo desse um dos principais mecanismos de toxicidade. Outro importante mecanismo de toxicidade do chumbo se dá pela sua capacidade de mimetizar o íon cálcio e interagir com diversas proteínas, como sua interação com a calmodulina através da interação com os grupamentos carboxilas (Moreira e Moreira, 2004).

O sistema nervoso é muito sensível à intoxicação por chumbo, sendo que a encefalopatia é um dos mais sérios acometimentos tóxicos induzidos pelo chumbo em adultos e crianças (Moreira e Moreira, 2004). De forma geral, o chumbo pode alterar o desenvolvimento do intelecto de crianças, resultando em redução do quociente de inteligência, baixo nível cognitivo, déficit de memória, e alterações comportamentais, tais como diminuição da atenção (Patrick, 2006; WHO, 2013). A neurotoxicidade ao chumbo ocorre principalmente por um aumento na liberação de neurotransmissores, desencadeada pela sua competição ou mimetização da ação do íon cálcio. Por este mecanismo, o chumbo promove alterações na entrada do cálcio na célula modificando a sinalização neuronal (Patrick, 2006).

No sistema gastrointestinal, intoxicações leves ao chumbo podem desencadear diarreia, constipação intestinal, desconforto epigástrico pós-prandial e anorexia (Moraes, 2014). Já exposições a altas concentrações de chumbo (40 e 200 µg/dL) podem causar cólica saturnina, caracterizada por espasmos intestinais que provocam dores abdominais intensas (Paoliello e Chasin, 2001; Kosnett, 2007).

O sistema hematológico também é um alvo importante da toxicidade do chumbo, comprometendo a síntese do heme e causando anemia. O chumbo apresenta grande afinidade ao grupo sulfidril das proteínas. A ligação do chumbo com o grupo-SH interfere na síntese do grupo heme, na molécula de hemoglobina, uma vez que o chumbo possui alta afinidade pelos eritrócitos (cerca de 99% do chumbo sanguíneo estão ligados às células vermelhas) (Lawton e Donaldson, 1991; Souza e Tavares, 2009). Em situações de contato prolongado e/ou de exposição às altas concentrações de chumbo, esse metal é capaz de diminuir a síntese da hemoglobina e estimular a eritropoese levando assim ao quadro de anemia (Moreira e Moreira, 2004).

Introdução

O sistema renal também é afetado pela ação tóxica do chumbo. Tanto exposições agudas quanto crônicas causam danos morfofuncionais renais em animais e humanos (WHO, 1995; Paoliello e Chasin, 2001; Patrick, 2006). A nefropatia plúmbica é caracterizada por um declínio progressivo da função renal geralmente acompanhada de hipertensão arterial (Moraes, 2014). Alguns estudos correlacionam a exposição ao chumbo, seus acometimentos renais e a elevação da pressão arterial, através do aumento da densidade de receptores beta adrenérgicos (Tsao *et al.*, 2000) e em consequência uma maior atividade simpática e aumento da produção de renina; acréscimo da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), que localmente causa produção de angiotensina II (Sharifi *et al.*, 2004).

Além dos efeitos da exposição ao chumbo nos diferentes sistemas descritos acima, vale ressaltar a ação tóxica deste metal no sistema cardiovascular. Devido sua relevância para o presente estudo, este assunto será abordado a seguir.

1.1.6.1 Efeitos Cardiovasculares

Já está bem estabelecida pela Organização Mundial de Saúde que as doenças cardiovasculares, tais como a cardiopatia isquêmica e o infarto do miocárdio, lideram o ranking das principais causas de morte no mundo. Em 2011, aproximadamente 17 milhões de pessoas morreram em decorrência das doenças cardiovasculares no mundo, e em 2030 estima-se que mais de 23 milhões de indivíduos irão morrer por esse problema (WHO, 2013). Nesse contexto, a exposição aos metais pesados, em especial ao chumbo, pode contribuir para o surgimento e agravamento desses processos patológicos. Estudos populacionais prévios identificaram uma associação positiva entre a exposição ao chumbo e a prevalência de doenças cardiovasculares (Lustberg e Silbergeld, 2002; Navas-Acien *et al.*, 2007).

Dentre as doenças cardiovasculares, múltiplos estudos em modelos animais (Vaziri, *et al.*, 1997, 1999, 2003; Fioresi *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2011; 2015) e populações humanas (Kosnett *et al.*, 2007; Navas-Acien *et al.*, 2008) têm mostrado relação entre a exposição ao chumbo e a hipertensão arterial. Alguns dos mecanismos propostos para explicar os efeitos do chumbo sobre a gênese da hipertensão arterial se justifica no fato de que esse metal está diretamente relacionado com o aumento da atividade simpática (Carmignani *et al.*,

2000) e da atividade da ECA plasmática (Fiorim *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2011); além de promover alterações nas células endoteliais (Fiorim *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015) e do músculo liso vascular (Marques *et al.*, 2001). Nesse sentido, a administração crônica desse metal pode induzir a produção e liberação de endotelina (Khalil-Manesh *et al.*, 1993), de radicais livres (Fiorim *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015) e diminuir a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Vaziri *et al.*, 1997, 1999; Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015).

A exposição ao chumbo pode desencadear outros acometimentos cardiovasculares. Fioresi e colaboradores (2014) demonstraram aumento da contratilidade miocárdica em ratos expostos ao chumbo por 30 dias. Estudos prévios do nosso grupo indicam também que este metal pode alterar a reatividade vascular em vasos de resistência (Simões *et al.*, 2015) e condutância (Fiorim *et al.*, 2011, 2012; Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015). Fiorim e colaboradores (2011) mostraram diminuição da reatividade vascular e aumento da biodisponibilidade de NO em aortas de animais expostos ao chumbo por sete dias. Já Silveira e colaboradores (2014), utilizando o mesmo modelo de administração controlada ao chumbo, evidenciaram aumento da reatividade vascular e diminuição da biodisponibilidade de NO em aortas após trinta dias de exposição ao metal. Estes resultados controversos podem estar relacionados com o tempo de exposição ao metal, sete e trinta dias respectivamente.

Apesar de vários estudos apontarem a exposição ao chumbo como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares os mecanismos pelos quais esse metal promove dano cardiovascular precisam ser melhores esclarecidos. No entanto, ainda são necessários estudos para determinar: as concentrações sanguíneas deste metal envolvidas no aumento da pressão arterial; as diferenças entre os efeitos das exposições agudas e crônicas e os mecanismos pelos quais o chumbo provoca estas alterações.

Assim, para melhor compreender os efeitos da exposição ao chumbo nos vasos sanguíneos, é necessária uma breve revisão sobre: músculo liso, endotélio vascular e das substâncias liberadas por este último, que participam na regulação do tônus vascular.

1.2 MÚSCULO LISO VASCULAR

O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante de resistência vascular. A regulação deste é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais. Para deflagrar a sua contração, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca^{+2} citoplasmático. Este aumento pode resultar tanto do influxo do Ca^{+2} através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto de liberação dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático. Deste modo, a oferta do Ca^{+2} à maquinaria contrátil será aumentada (Lincoln *et al.*, 2001).

Estudos prévios demonstraram que o tratamento com acetato de chumbo promove alterações no tônus vascular (Fiorim *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015). Estas alterações parecem ser decorrentes do desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Neste contexto, torna-se essencial o conhecimento do endotélio e de algumas vias que participam do controle do tônus vascular.

1.3 ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio é constituído por uma camada de tecido pavimentoso localizado entre o sangue o músculo liso vascular, servindo como uma barreira semi-permeável, regulando o fluxo de nutrientes e substâncias. Além disso, o endotélio é fundamental no controle do tônus vascular por liberar vários fatores que modulam a contratilidade e o relaxamento do músculo liso vascular (Triggle, 2003; Kolluru *et al.*, 2010).

Os principais fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio são: o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a prostaciclina. Dentre os principais fatores contráteis estão: as prostaglandinas, os tromboxanos, a endotelina I, a angiotensina II e as espécies reativas do oxigênio (EROS) (Félétou e Vanhoutte, 2009). A Figura I elucida os fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. O equilíbrio na produção desses mediadores é importante para regulação do tônus vascular. Já está bem esclarecido na literatura científica que a exposição ao chumbo

promove alterações endoteliais e estas podem ser fortemente associadas à hipertensão arterial, com um concomitante aumento de morbidades e mortalidade (Triggle *et al.*, 2003).

Fiorim e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento com acetato de chumbo por sete dias alterou a função endotelial de aorta de ratos. Estas alterações parecem ser decorrentes do aumento da biobisponibilidade de NO e da participação dos canais para K^+ . Neste sentido torna-se necessária uma abordagem sobre o óxido nítrico, canais para K^+ e o receptor da Angiotensina II do subtipo AT_2 , considerando este último uma das possíveis vias pelo qual o chumbo poderia estar aumentando a biodisponibilidade de NO.

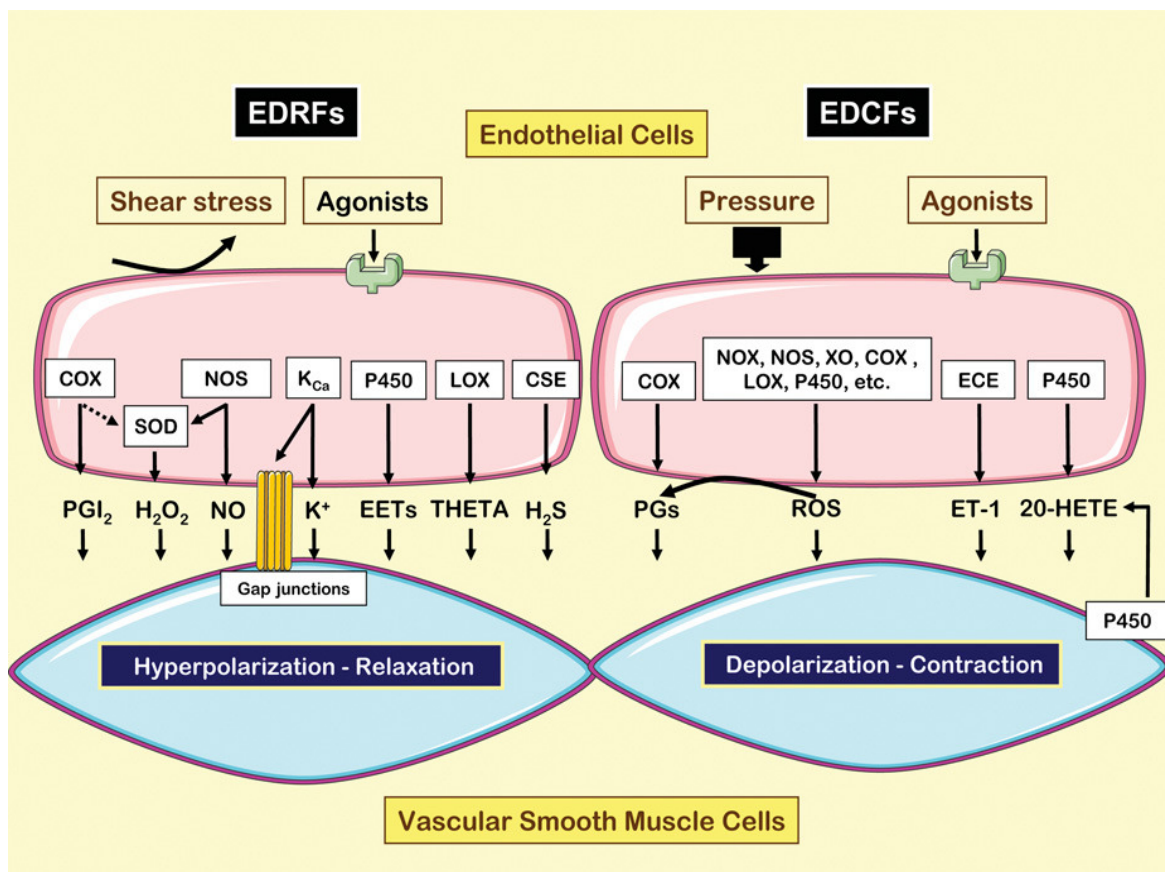


Figura I: Fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. 20-HETE, o ácido 20-hidroxi-eicosatetraenoico; KCa, canais para potássio ativados por cálcio; COX, ciclooxigenase; LOX, lipooxigenase; EC, células endoteliais; EDCF, fatores vasoconstritores derivados do endotélio; EDRFs, fatores vasodilatadores derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; NOS, óxido nítrico; H_2O_2 , o peróxido de hidrogénio; NOX, NAD(P)H-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI_2 , prostaciclina; PGs, prostaglandinas; ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido-dismutase; ET-1, endotelina; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase; H_2S , sulfeto de hidrogénio. (Fonte: Félétou e Vanhoutte, 2009).

Introdução

1.4 ÓXIDO NÍTRICO

O NO é um radical livre inorgânico altamente reativo, em estado gasoso, o que o permite difundir facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação. Sua síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios da L-arginina que é convertido em L-citrulina, reação que é catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS). Em condições fisiológicas o relaxamento ocorre pela estimulação de receptores (da acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) na membrana das células endoteliais ou quando há um aumento do atrito das células circulantes na camada endotelial levando a ativação da NOS e consequente produção de NO (Fèlètou e Vanhoutte, 2009).

Este radical livre está envolvido regulação do crescimento celular, além de possuir ação inibitória sobre a adesão e agregação plaquetária (Moncada *et al.*, 19991; Cannon III, 1998) (Figura II).

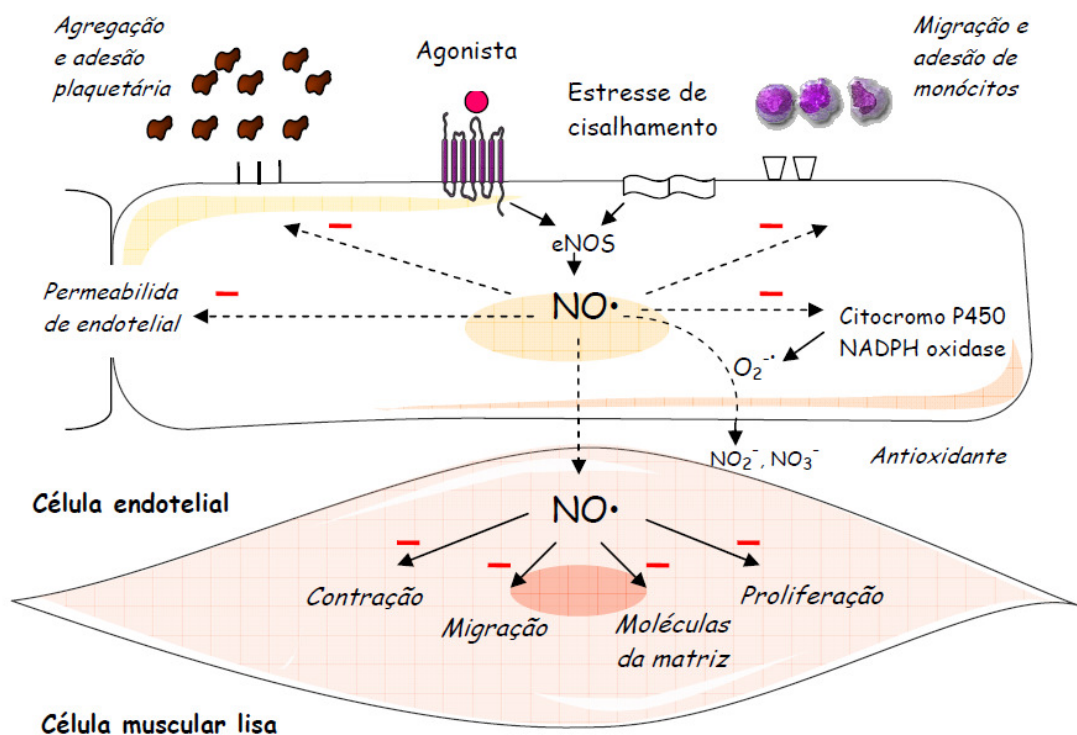


Figura II: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular (Rattmann, 2009).

O NO, produzido pelas células endoteliais se difunde rapidamente para as células musculares lisas onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel. Quando ativada, esta enzima promove a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O aumento da concentração de GMPc leva à ativação da proteína quinase G (PKG), que atua por diversos mecanismos, promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular (Moncada *et al.*, 1991., Cannon III., 1998).

A PKG ativa canais para K^+ dependentes de Ca^{+2} , inibindo assim a entrada de Ca^{+2} do conteúdo extracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana. Esta proteína quinase pode atuar também no retículo sarcoplasmático (SERCA) estimulando a recaptação do Ca^{+2} , na fosforilação da cadeia leve da miosina, tornando-a menos sensível aos íons Ca^{+2} e no trocador Na^+/Ca^{+2} na membrana plasmática (estimulando a saída de Ca^{+2}) (Lincoln *et al.*, 2001). O NO promove ainda a ativação direta de canais de K^+ , levando a hiperpolarização da célula muscular lisa (Bolontina *et al.*, 1994; Félétou e Vanhoutte, 1999, 2010). Todos estes mecanismos contribuem para a diminuição da Ca^{+2} intracelular, e conseqüentemente no relaxamento do músculo liso vascular (Moncada *et al.*, 1991., Cannon III, 1998; Lincoln *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003) (Figura III).

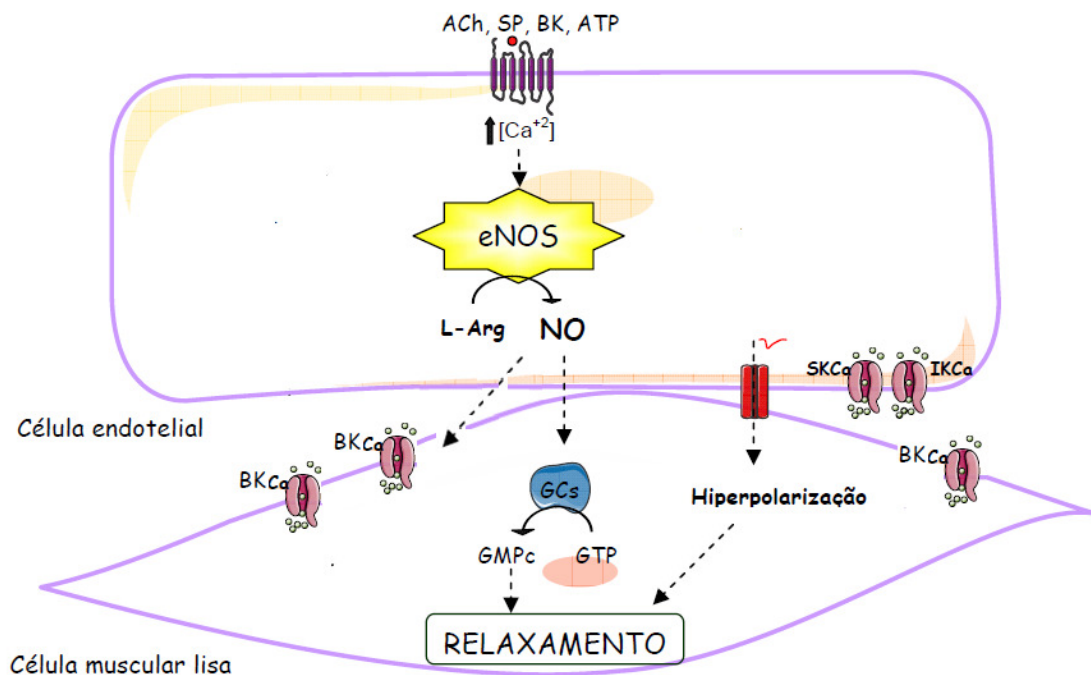


Figura III: Via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS. Esta via pode ser ativada após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorre o aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, este mediador exerce sua ação nas células musculares lisas, através da produção do segundo mensageiro, GMPc, ou ainda através da hiperpolarização (modificado de Rattmann, 2009).

Já está bem estabelecido na literatura que a exposição ao chumbo pode alterar a biodisponibilidade de NO, entretanto os achados são ambíguos. Estudos de exposição crônica ao chumbo têm demonstrado diminuição da biodisponibilidade de NO (Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015), outros achados, como de Fiorim *et al.*, (2011) relatam aumento da biodisponibilidade de NO após sete dias de exposição ao chumbo.

Mediante ao exposto e sabendo que o NO induz a vasodilatação através de diferentes vias, incluindo a ativação de canais para K^+ , uma breve revisão sobre os canais para K^+ torna-se necessária.

1.5 CANAIS PARA POTÁSSIO

O potássio (K^+) é o íon mais abundante no meio intracelular, com maior permeabilidade e influência sobre o potencial de membrana (Pm). Como a concentração intracelular de K^+ é muito maior que a concentração extracelular, a abertura dos canais para K^+ induz efluxo deste íon e, conseqüentemente, uma alteração do Pm em direção a valores mais negativos (repolarização ou hiperpolarização) (Haddy *et al*; 2006; Nelson e Quayle, 1995). Assim, os canais para K^+ desempenham papel chave na regulação do tônus do músculo liso vascular (Nelson e Quayle, 1995; Félétou e Vanhoutte, 2006, 2009; Dias *et al.*, 2014).

A abertura dos canais para K^+ do endotélio e MLV contribuem para a manutenção do potencial de membrana, através do efluxo de K^+ , resultando em hiperpolarização da membrana. Em um Pm mais negativo os canais para Ca^{+2} voltagem-dependentes fecham-se diminuindo a entrada do íon cálcio, promovendo a vasodilatação. Ao contrário, quando os canais para K^+ são inibidos há uma despolarização da membrana celular que ocasiona a abertura dos canais para Ca^{+2} , com conseqüente aumento da concentração de cálcio intracelular e vasoconstrição (Nelson e Quayle, 1995; Sobey, 2001; Ko *et al*; 2008).

As CMLV, *in vitro*, apresentam em Pm entre -40 e -60 mV quando submetidas a uma pressão intravascular normal. Segundo Nelson e Quayle, (1995), o Pm do MLV primariamente regula a contratilidade através da alteração do influxo de cálcio pelos canais para Ca^{+2} voltagem-dependentes. Todavia, o Pm pode também regular a entrada de Ca^{+2} através do trocador Na^+/Ca^{+2} , bem como pode influenciar a liberação de Ca^{+2} através da produção de trifosfato de inositol. Uma despolarização ou hiperpolarização de 3 mV do potencial de membrana da CMLV, pode alterar o influxo de Ca^{+2} para o sarcoplasma. Assim, qualquer agente farmacológico ou fisiológico que alterar o Pm da CMLV poderá ocasionar uma alteração significativa no diâmetro do vaso.

Neste contexto, a hiperpolarização da membrana através da abertura de canais para K^+ , promove vasodilatação e constitui um importante mecanismo na diminuição da pressão arterial (Nelson e Quayle, 1995). Todavia, a inibição dos canais para K^+ causa despolarização levando a vasoconstrição (Nelson e Quayle, 1995). Então, alterações nas funções dos canais para K^+ do MLV poderiam estar

Introdução

envolvidas na gênese de doenças como hipertensão arterial sistêmica (Sobey, 2001; Callera *et al*; 2004) e diabetes (Kamata *et al*; 1989).

1.5.1 Subtipos de Canais para Postássio

Já está bem estabelecido na literatura científica que os canais para K^+ expressos no endotélio e músculo liso vascular contribuem para a manutenção do potencial de membrana, através do efluxo de K^+ , resultando em hiperpolarização da membrana e consequente vasodilatação. Por outro lado, a inibição desses canais leva à despolarização da membrana e à vasoconstrição. Quatro subtipos de canais para K^+ foram identificados e são os responsáveis por executar esta função: os canais para K^+ voltagem dependentes (K_v); os canais para K^+ retificador (K_{ir}); os canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e os canais para K^+ ativados por alterações de Ca^{+2} intracelular, que podem ser subdivididos em: canais para K^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}); os canais para K^+ ativados por cálcio de intermediária condutância (IK_{Ca}); os canais para K^+ ativados por cálcio de baixa condutância (SK_{Ca}); (Nelson e Quayle, 1995; Ledoux *et al.*, 2006; Féléto e Vanhoutte, 2006, 2009).

1.5.1.1 Canais para K^+ Voltagem dependentes (K_v)

Os K_v presentes nas membrana celular do MLV são ativados pela despolarização da membrana quando esta atinge o P_m situado entre os -35mv e os -55mv. A função de K_v estaria então relacionada a limitação da despolarização e a manutenção do potencial de repouso da membrana celular com consequente controle do tônus vascular (Sobey, 2001).

Os K_v apresentam uma estrutura tetramérica composta por seis domínios transmembrana (S1-S6) que formam a subunidade α . O domínio S4 forma o sensor de voltagem deste canal. Entre os domínios S5-S6 encontra-se a região H5 ou poro, por onde o canal é permeável ao K^+ . Na arquitetura deste canal ainda está presente uma subunidade β que possivelmente serve para ancorar o canal à membrana (Nelson e Quayle, 1995).

Estudos prévios mostram que várias subfamílias de K_v tem sido identificadas e são expressas em CMLV de diversos vasos (Nelson e Quayle, 1995; Tammaro *et al.*; 2004). Tammaro *et al.*, (2004) sugeriram em seu trabalho que $K_{v2.1}$ seria o maior responsável pelas as correntes de K^+ em aorta de ratos. Estes pesquisadores atribuíram a esta isoforma a capacidade de modulação da atividade contrátil da aorta. Em adição, Dias *et al.*, (2014) também mostraram maior participação dos K_v em aorta de ratos machos.

Os K_v podem ser inibidos de forma seletiva pela 4-aminopiridina (Nelson e Quayle, 1995). As vias de sinalização envolvidas na ativação dos K_v incluem: a proteína quinase A (PKA) dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que está relacionada ao mecanismo de ação de vasodilatadores semelhantes a adenosina, prostaglandina 2 (PGI_2), o NO via guanosina monofosfato cíclico (GMPc); e a diminuição do pH, que é descrito ativando os K_v em miócitos de coronária. As vias de inativação dos K_v são: a proteína quinase C (PKC); o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular; assim como, as Rho quinases (Sobey, 2001; Jackson, 2005).

1.5.1.2 Canais para K^+ dependentes de Cálcio (K_{Ca})

Estes canais foram assim definidos tendo por base a sua ativação pelo aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular. Todavia, estes também aumentam sua atividade com a despolarização e por ação de alguns estímulos vasodilatadores. Os K_{Ca} são subdivididos em: canais para K^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}); os canais para K^+ ativados por cálcio de baixa condutância (SK_{Ca}) e de intermediária condutância (IK_{Ca}) (Nelson e Quayle, 1995; Wrzosek, 2009; Ledoux *et al.*, 2006; Félétou e Vanhoutte, 2006, 2009).

1.5.1.2.1 Canais para K^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca})

Os BK_{Ca} são denominados canais para potássio ativados por cálcio de larga condutância (200 – 250 pS) e estão envolvidos na regulação do tônus miogênico, contribuindo para o controle da RVP e regulação do potencial de membrana do MLV (Ledoux *et al.*; 2006; Félétou e Vanhoutte, 2009).

Introdução

Estruturalmente, os BK_{Ca} são divididos em duas subunidades alfa e beta. A subunidade alfa do canal possui 11 domínios transmembrana (S0 – S10). Assim, comparados a outros canais para K⁺, a região S4 forma o sensor deste canal e região do poro está localizada nos domínios S5 – S6. Estudos prévios consideram a subunidade alfa do BK_{Ca} um local de grande afinidade às variações da concentração de Ca⁺² intracelular e poderia ser considerado um sítio de ligação para o cálcio (Ledoux *et al*; 2006; Ko *et al*; 2008).

Segundo Ledoux *et al*; (2006) a subunidade β do BK_{Ca} interage com o domínio S0 da subunidade α aumentando a voltagem e a sensibilidade dos BK_{Ca}. Recentemente, foram identificadas quatro subunidades β do BK_{Ca} (1 - 4), mas a subunidade predominante em MLV é a β1.

Os BK_{Ca} estão co-localizados aos receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático e no sarcolema, nas proximidades do retículo sarcoplasmático. Esta distribuição dos BK_{Ca} na membrana da célula do MLV que permite aos mesmos entrarem em contato com o Ca⁺² liberado através dos *sparks* de Ca⁺² (> 10 μM) (Ledoux *et al*; 2006; Félétou e Vanhoutte, 2009).

Conceitualmente os *sparks* são liberações de Ca⁺² resultantes da abertura dos canais para rianodina do retículo sarcoplasmático que geram uma grande elevação da concentração de Ca⁺² (10 – 100 μM) em uma área restrita da célula (cerca de 1% do volume celular). Funcionalmente, os *sparks* aumentam a concentração local de Ca⁺² e ativam os BK_{Ca}. Estes canais promovem o efluxo de K⁺ e causam hiperpolarização da membrana (Figura IV). Por outro lado, a inibição dos *sparks* por bloqueio dos receptores de rianodina, ou dos canais BK_{Ca} por iberiotoxina (inibidor seletivo dos BK_{Ca}), induz à despolarização da membrana, ativação dos canais para Ca⁺² voltagem dependentes do tipo L, promovendo a vasoconstrição (Ledoux *et al*; 2006; Félétou e Vanhoutte, 2009).

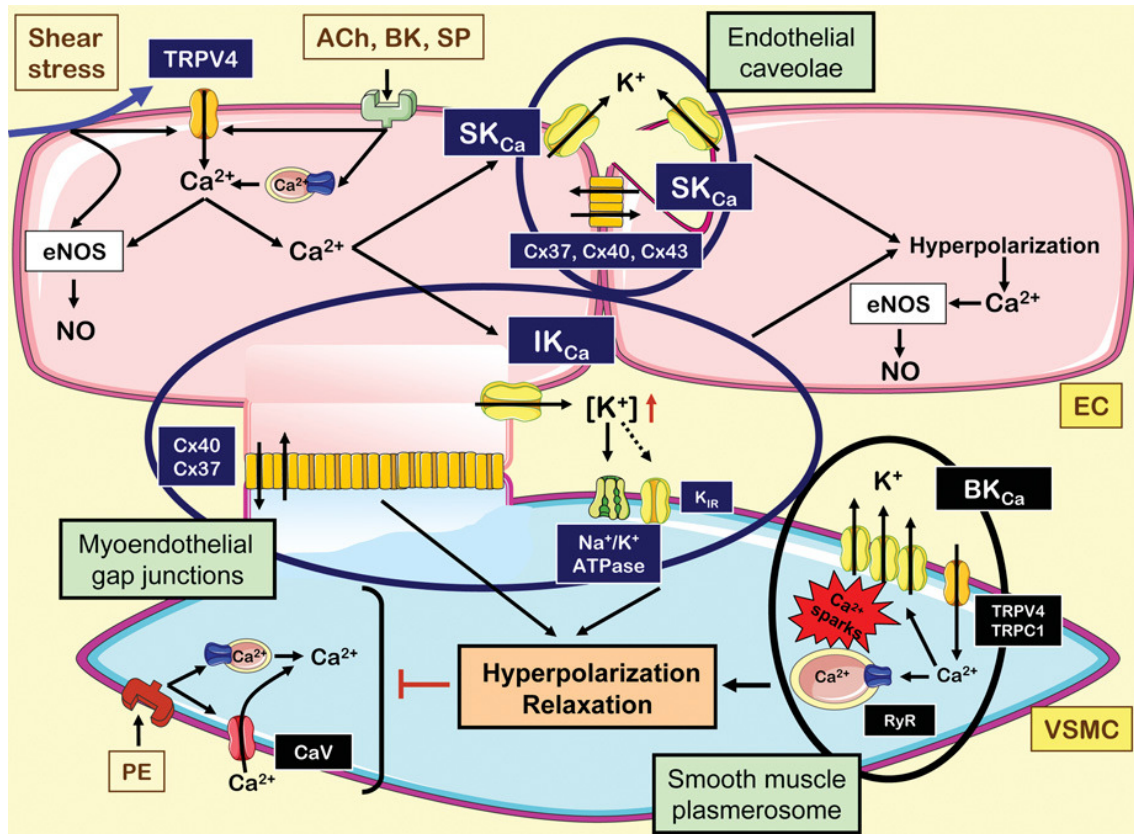


Figura IV: Distribuição espacial e funcional dos canais para potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}). Os três subtipos de K_{Ca} , os BK_{Ca} , IK_{Ca} e canais SK_{Ca} , estão presentes na parede vascular, mas com a localização muito específica. Os BK_{Ca} estão expressos no MLV, próximos ao retículo endoplasmático. Os IK_{Ca} e SK_{Ca} (especialmente a subunidade α SK3) são constitutivamente expressas em células endoteliais. Os SK_{Ca} estão difusamente distribuídos nas junções endoteliais, especialmente na região das caveolas, e estão associados com várias conexinas (Cxs). Os IK_{Ca} são preferencialmente localizadas nas junções mioendoteliais. ACh, a acetilcolina; BK, bradicinina; PE, fenilefrina; RyR, receptor ryanodina; SP, substância P; $Na^+ / K^+ -ATPase$ e canais para potássio retificadores de influxo (K_{IR}) (Fonte: Félétou e Vanhoutte, 2009).

De maneira resumida, as vias de ativação dos BK_{Ca} incluem: despolarização, aumento da $[Ca^{+2}]_{cit}$, NO, monóxido de carbono (CO), PKA e PKG. Por outro lado, estes canais são inibidos por hiperpolarização, diminuição da $[Ca^{+2}]_{cit}$ e PKC (Félétou e Vanhoutte, 2006; Wrzosek, 2009; Félétou, 2009). Está bem estabelecida na literatura científica que algumas substâncias derivadas do endotélio estão envolvidas na modulação da atividade dos BK_{Ca} no MLV. O NO é capaz de ativar diretamente (Bolotina *et al.*, 1994) e indiretamente os BK_{Ca} . Neste último caso impedindo a formação de um inibidor endógeno (Alonso-Galicia *et al.* 1997; Sun *et*

Introdução

al., 1998). Já as espécies reativas de oxigênio são consideradas uma influência modulatória negativa sobre a atividade dos BK_{Ca} em doenças cardiovasculares (Félétou, 2009).

Estudos mostram que os BK_{Ca} podem ser inibidos por bloqueadores não específicos como o TEA e a caribdotoxina. Entretanto, a Iberiotoxina, uma toxina do escorpião, é considerada o bloqueador mais específico destes canais (Callera *et al* 2004; Tammaro *et al.* 2004; Ledoux *et al.* 2006).

1.5.1.2.2 Canais para K⁺ ativados por cálcio de Baixa condutância (SK_{Ca}) e intermediária condutância (IK_{Ca})

Os canais SK_{Ca} são denominados canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância (10 - 40 pS) e estão envolvidos no controle do tônus vascular e da pressão arterial (Ledoux *et al*; 2006). Quatro famílias de SK_{Ca} foram identificadas (SK_{Ca} 1- 4). Os canais SK_{Ca} 1, 2 e 3 são descritos como canais de baixa condutância. Já SK_{Ca} 4 também é conhecido como IK_{Ca} pois possui condutância intermediária (Ledoux *et al*; 2006).

Estruturalmente o canal é formado por seis domínios transmembrana (S1 – S6) com terminações amino e carboxila no meio intracelular. A região do poro está localizada na região S5-S6 de forma similar ao que acontece com as demais isoformas de canais para potássio (Ledoux *et al.*, , 2006).

Os SK_{Ca} são expressos em neurônios, epitélio, endotélio vascular, e em vários tipos de músculo liso, mas são pobremente expressos em MLV. A subunidade SK_{Ca}3 é constitutivamente expressa nas células endoteliais (Ledoux *et al.*, 2006; Félétou, 2009). Os SK_{Ca} e IK_{Ca} (SK_{Ca} 4) apresentam uma localização espacial diferente nas células endoteliais Os SK_{Ca} estão difusamente distribuídos nas junções endoteliais, especialmente nas regiões das cavéolas, e estão associados com várias conexinas (Cxs). Já os IK_{Ca} (SK_{Ca} 4) são preferencialmente localizadas nas junções mioendoteliais. (Figura IV) (Félétou, 2009).

Funcionalmente, a ativação dos SK_{Ca} devem-se ao aumento da [Ca⁺²]_{cit} e a inibição destas se dá pela diminuição da [Ca⁺²]_{cit}. Vale ressaltar que a abertura do poro de SK_{Ca} é independente do potencial de membrana e extremamente dependente da concentração de Ca⁺² e da participação da calmodulina (Figura IV) (Ledoux *et al.*, 2006; Félétou, 2009). A calmodulina está ligada à terminação

carboxila do SK_{Ca}, conferindo ao canal a sensibilidade ao cálcio. A ligação do cálcio com a calmodulina induz uma mudança conformacional do canal que leva a abertura do poro (Ledoux *et al.*, 2006).

Estudos prévios mostram que a apamina, uma toxina extraída da abelha, é capaz de inibir seletivamente os SK_{Ca} 1 a 3. Já os IK_{Ca} (SK_{Ca} 4) podem ser inibidos não seletivamente pela caribdotoxina, toxina extraída do veneno de escorpião (Ledoux *et al.*, 2006; Féléto, 2009).

1.5.1.3 Canais para K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Os canais para K⁺ sensíveis a adenosina trifosfato (ATP) são assim nomeados tendo por base a sensibilidade para o ATP intracelular que inibe a sua atividade. Por outro lado, o aumento da adenosina difosfato (ADP) intracelular é capaz de ativar o K_{ATP}. Desta forma, o K_{ATP} responde as alterações do estado metabólico da célula (Nelson e Quayle, 1995; Sobey, 2001).

A diminuição da PaO₂, do pH e vasodilatadores como adenosina, PGI₂, CGRP e NO podem ativar os K_{ATP} através da fosforilação das proteínas quinase A e G, bem como aumento dos níveis de AMPc e GMPc. Ao contrário, vasoconstritores como norepinefrina, vasopressina, endotelina e angiotensina II fecham estes canais através da ativação da PKC e elevação da [Ca⁺²]_{cit} (Nelson e Quayle, 1995; Jackson, 2005; Fozard e Manley, 2001).

Os K_{ATP} estão localizados no MLV e de forma similar aos demais canais para K⁺, os estímulos capazes de ativar a corrente através de K_{ATP} promovem a hiperpolarização da membrana que possibilita o fechamento dos canais voltagem-dependentes de Ca⁺², ocasionando uma redução nas [Ca⁺²]_{cit} e vasodilatação. Assim, estes canais contribuem para regulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo (Nelson e Quayle, 1995; Sobey, 2001).

Estudos prévios mostram o envolvimento dos K_{ATP} na gênese de doenças cardiovasculares como hipertensão e diabetes (Nelson e Quayle, 1995; Fozard e Manley, 2001). Segundo Dick e Tune (2009), os K_{ATP} são importantes na vasodilatação coronariana, mediante situação de isquemia.

Introdução

Alguns trabalhos sugerem que a glibenclamida, um bloqueador seletivo destes canais, tem sido considerada um importante mecanismo de investigação do papel dos K_{ATP} na função celular (Nelson e Quayle, 1995; Ko *et al*; 2008).

1.5.1.4 Canais para K^+ retificadores de influxo (K_{IR})

Os canais para K^+ retificadores de influxo (K_{IR}) são assim nomeados, pois atuam retificando o influxo de K^+ . Estes canais permitem o influxo de K^+ à medida que a membrana da célula se hiperpolariza e o efluxo de K^+ à medida que a célula se despolariza. Vale ressaltar que os K_{IR} são ativados pela hiperpolarização da membrana, em contraste aos K_v e K_{Ca} que são ativados por despolarização (Nelson e Quayle, 1995; Jackson, 2000).

Estruturalmente, este canal é considerado um tetrâmero e constituído por várias subfamílias. A subfamília K_{IR} 2.0 apresenta propriedade retificadora. Sugere-se que o K_{IR} 2.1, mas não K_{IR} 2.2 ou K_{IR} 2.3, seja expressa no MLV. Estes canais são abundantes em vasos de resistência como as mesentéricas, coronárias e arteríolas cerebrais (Nelson e Quayle, 1995; Ko *et al*; 2008). Assim, acredita-se que os K_{IR} contribuam para a manutenção do Pm e tônus de repouso em vasos de pequeno diâmetro (Nelson e Quayle, 1995; Jackson, 2000; Sobey, 2001). A regulação do Pm impossibilita a hiperpolarização da membrana para valores mais negativos que o potencial de equilíbrio do K^+ , mantido pela atividade da Na^+K^+ -ATPase, minimizando a perda celular de K^+ e, desta forma reduzindo o gasto energético durante a sustentada despolarização da membrana. Além disso, estes canais seriam ativados em resposta ao aumento da concentração extracelular de K^+ ocasionando vasodilatação (Nelson e Quayle, 1995).

Os K_{IR} podem ser ativados por hiperpolarização e aumento da concentração de K^+ extracelular. Contudo, podem ser inibidos pela despolarização e diminuição do K^+ extracelular. Esta bem estabelecida na comunidade científica que estes canais podem ainda ser bloqueados seletivamente utilizando uma concentração 50 μM do íon bário (Ba^{+2}) (Nelson e Quayle, 1995; Jackson, 2000). Estudo prévio sugere que os K_{IR} estão envolvidos em doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial e a aterosclerose (Nelson e Quayle, 1995).

Conhecidos os principais canais para K^+ expressos no endotélio e no MLV que contribuem para manutenção do tônus vascular e considerando os achados de

Fiorim e colaboradores (2011) de aumento de biodisponibilidade de NO após a exposição por sete dias ao chumbo, por conseguinte, torna-se necessária uma abordagem sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT_2 , considerando este último uma das possíveis vias pelo qual o chumbo poderia estar aumentando a biodisponibilidade de NO.

1.6 RECEPTOR DA ANGIOTENSINA II DO SUBTIPO AT_2

A cascata de produção da Angiotensina II advém de reações ocorridas inicialmente na circulação renal e depois na circulação sistêmica. Esta via de ativação se inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais quando estimuladas por uma redução da pressão arterial ou desequilíbrio hidro-eletrolítico. Assim, a pré-pró-renina, um peptídeo não ativo, se transforma em pró-renina. Posteriormente, a pró-renina, através da proteólise celular transforma-se em renina. Esta, ao ser liberada, irá atuar sobre o angiotensinogênio, que será clivado, gerando a angiotensina I. Esta, por sua vez, sofrerá ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) no pulmão, originando a angiotensina II (Crackower *et al.*, 2002; Touyz e Schiffrin, 2000).

A ECA existe no plasma, como um hormônio circulante e se expressa em diversos tecidos como o endotélio vascular, o endotélio dos túbulos proximais renais, coração, pulmão, rim, adrenal, e órgãos reprodutivos. Seu papel é promover a clivagem dipeptídica carboxi-terminal de alguns peptídios atuando assim, na regulação do tônus vascular pela conversão do peptídeo inativo angiotensina I em angiotensina II, além de inativar a bradicinina (vasodilatadora) e a substância P. (Touyz e Schiffrin, 2000).

A angiotensina II exerce efeitos locais, como nos vasos sanguíneos, rins, coração e sistema endócrino. Esta enzima realiza ainda importante papel na regulação da pressão sanguínea (Griedling *et al.*, 1996; Crackower *et al.*, 2002; Lacolly *et al.*, 2009).

Os efeitos da angiotensina II sobre o organismo são mediados por receptores específicos da membrana, o receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT_1) e o receptor de angiotensina do subtipo 2 (AT_2). A maioria das ações fisiológicas da Ang II, quase todas prejudiciais, são mediadas via receptor AT_1 . Em contraste, sua interação com

Introdução

receptor AT_2 modula negativamente as ações dos receptores AT_1 na maioria das circunstâncias e geralmente possuem efeitos benéficos (Shetal e Carey, 2013).

A união entre da angiotensina II com o receptor AT_1 culmina em contração do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Touyz e Schiffrin, 2000; Garrido e Griendling, 2009). Por outro lado, a interação da angiotensina II com o receptor AT_2 está relacionada com a liberação de NO promovendo vasodilatação, efeitos antiproliferativos e apoptose. (Griendling *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005).

Os receptores AT_2 são expressos em níveis elevados no feto, mas sua expressão parece diminuir amplamente após do período neonatal em alguns tecidos. Em adultos, estes receptores são expressos nos rins, córtex adrenal, ovários, útero, coração e sistema vascular, especialmente o endotélio. Já está bem estabelecido na literatura científica o aumento da expressão do receptor AT_2 em condições como injúria vascular, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e insuficiência renal (Griendling *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005).

A união entre da angiotensina II com o receptor AT_2 ativa a via de produção do NO e GMPc que estão envolvidos no processo de relaxamento do MLV. Estudos prévios demonstraram que a vasodilatação induzida pelo receptor AT_2 pode ser mediada pela ativação da cascata bradicinina, NO e GMPc (Yayama *et al.*, 2006; Shetal e Carey, 2013). A Figura 4 mostra que a estimulação dos receptores AT_2 aumenta produção local de bradicinina em vasos, que por sua vez, estimula receptores B_2 para ativar a cascata NO / cGMP (Shetal e Carey, 2013). A bradicinina, pode induzir a fosforilação da eNOS nas Ser¹¹⁷⁷ e Ser⁶³³ através da ativação da proteína quinase A (PKA) (Yayama *et al.*, 2006) e na Ser¹¹⁷⁷ através da ativação da proteína serina treonina quinase (Akt) (Shetal e Carey, 2013). Vale ressaltar que o receptor AT_2 pode aumentar a produção de NO de maneira direta, independente da produção bradicinina (Shetal e Carey, 2013).

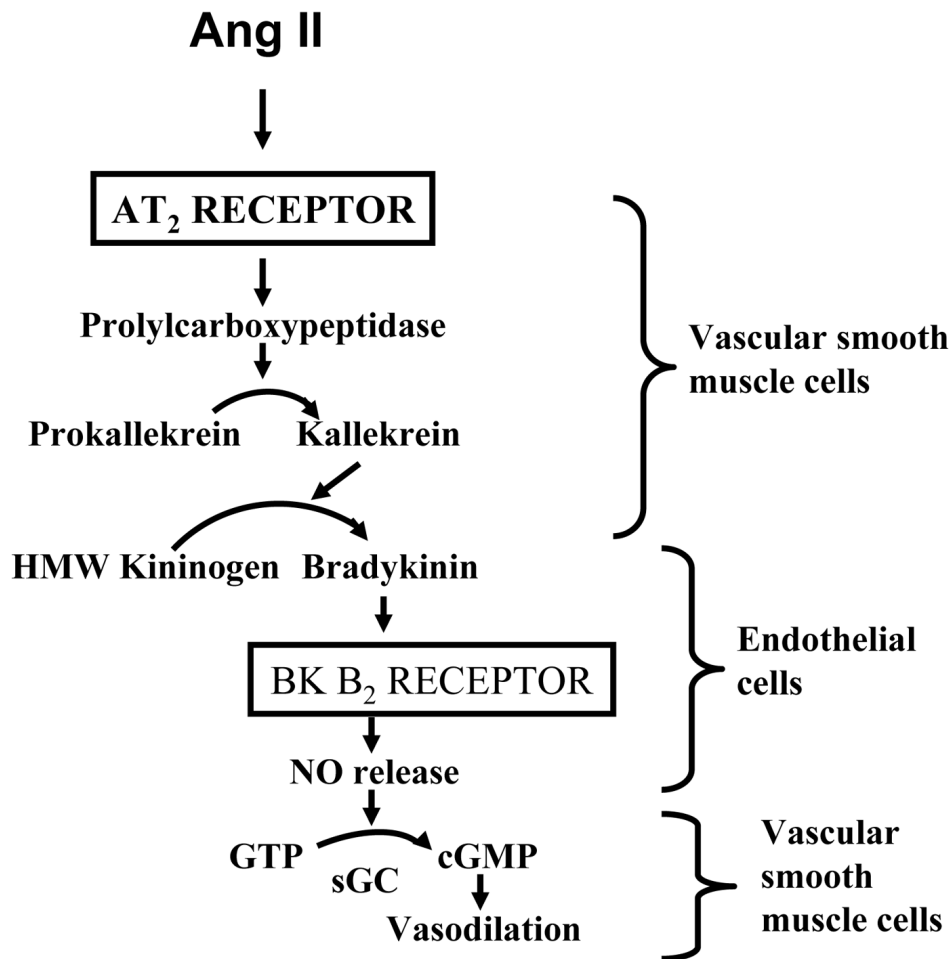


Figura V: Vasodilatação induzida pelo receptor AT_2 , mediada pela ativação da cascata bradicinina, NO e GMPc. A estimulação dos receptores AT_2 aumentam produção local de bradicinina em vasos, que por sua vez, estimula receptores B_2 para ativar a cascata NO / cGMP. Bradicininina (BK), receptor de bradicininina 2 ($BK B_2$), Calicreína, CGs (guanilato ciclase solúvel), monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), trifosfato de guanosina (GTP) (Shetal e Carey, 2013).

Estudos recentes mostram que os receptores AT_2 desempenham um papel de contra-regulação benéfica sobre a função cardiovascular. A expressão e/ou atividade reduzida dos receptores AT_2 podem contribuir para o processo de formação de edema, inflamação e fibrose levando a danos no tecido cardiovascular e o agravamento de doenças como a hipertensão arterial. Os efeitos vasodilatador e hipotensor da ativação dos receptores AT_2 podem ser visualizados a curto e em longo prazo e não estão associados à dessensibilização dos receptores, tornando-os assim um potencial alvo terapêutico (Shetal e Carey., 2013).

Diversos estudos mostram que a exposição ao chumbo promove alterações do sistema renina- angiotensina (Boscolo e Carminghani, 1988; Vaziri *et al.*, 2001),

Introdução

incluindo o aumento da atividade da ECA plasmática (Sharifi *et al.*, 2004; Fiorim *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2011). Uma pesquisa realizada com sete dias de exposição ao chumbo mostrou aumento da atividade da ECA plasmática, sugerindo consequente aumento dos níveis de angiotensina II nos animais expostos ao metal. Somam-se a esses achados uma correlação positiva entre o aumento da atividade da ECA e o aumento da PAS, sugerindo que o sistema renina angiotensina seja o mediador das alterações da pressão arterial (Fiorim, 2011).

Já está bem estabelecido na literatura que a angiotensina II aumenta a biodisponibilidade de NO em de aorta torácica (Pueyo *et al.*, 1998; Yayama *et al.*, 2006). Considerando que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo aumentou a ECA plasmática e a biodisponibilidade de NO em aorta de ratos (Fiorim *et al.*, 2011), poderíamos especular o envolvimento dos receptores AT₂ neste aumento de biodisponibilidade de NO nos animais chumbo.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a exposição ao chumbo está sendo reconhecida como um sério problema de saúde ocupacional e ambiental. Assim, os estudos da exposição a baixas concentrações de chumbo, mesmo que conduzidos em animais, podem despertar a atenção dos órgãos públicos responsáveis pelo controle da emissão deste metal, assim como para uma revisão dos valores considerados limites de exposições ocupacionais e não ocupacionais. Nos últimos anos, estudos realizados em nosso laboratório tentam elucidar os efeitos tóxicos do chumbo sobre o sistema cardiovascular, em plumbemia inferior ao limite estabelecido pelas legislações internacionais (Fiorim *et al.*, 2011, 2012; Silveira *et al.*, 2014; Fiorelli *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2011, 2015).

Fiorim e colaboradores (2011) mostraram que a exposição ao chumbo, mesmo em baixa concentração sanguínea (~10µg/dL), aumentou a PAS, diminuiu a reatividade vascular e aumentou a biodisponibilidade de NO em aortas de ratos. Os principais achados do referido trabalho conduziram os autores a novos questionamentos. Por qual via o acetato de chumbo, em baixa concentração e na fase inicial de exposição (sete dias), poderia aumentar a biodisponibilidade de NO e assim, diminuir a resposta à fenilefrina?

Sabendo que o NO induz a vasodilatação através de diferentes vias, incluindo a ativação de canais para K^+ (Bolontina *et al.*, 1994; Félétou, 2009), seria possível que a redução de reatividade vascular, atribuída a maior liberação de NO, observada nos animais expostos ao Pb envolveria a ativação de canais para potássio?

Além disso, estudos prévios mostram que a angiotensina II pode aumentar a biodisponibilidade de NO em de aorta torácica (Pueyo *et al.*, 1998; Yayama *et al.*, 2006). Considerando que o chumbo aumentou a ECA plasmática e a biodisponibilidade de NO em aorta de ratos (Fiorim *et al.*, 2011), poderíamos especular também que a angiotensina II, via receptores AT_2 , estaria promovendo o aumento de NO.

Portanto, diante das considerações acima, o presente estudo levanta duas hipóteses: **(1)** Estaria o receptor da Angiotensina II do subtipo AT_2 envolvido no aumento da biodisponibilidade de NO nos animais chumbo? **(2):** Seria possível o NO induzir vasodilatação através de uma maior ativação dos canais para K^+ nos animais chumbo?

Desta forma, um estudo sobre o envolvimento dos receptores AT_2 no aumento da biodisponibilidade de NO e a participação dos canais para K^+ em aorta de ratos expostos ao chumbo perfazem os objetivos do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se via receptores AT_2 , o acetato de chumbo, em baixa concentração e na fase inicial de exposição (sete dias), poderia aumentar a biodisponibilidade de NO e assim, diminuir a resposta à fenilefrina.

Sabendo que o NO induz a vasodilatação através de diferentes vias, incluindo a ativação de canais para K^+ , o presente estudo objetivou também investigar a participação dos canais para K^+ em aorta de ratos expostos ao chumbo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar se o tratamento por sete dias com acetato de chumbo promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina;

Verificar se o chumbo altera o relaxamento vascular dependente e independente do endotélio;

Estudar participação do óxido nítrico e do receptor AT_2 na reatividade vascular à fenilefrina.

Avaliar se via receptores AT_2 , o chumbo estaria promovendo aumento da biodisponibilidade de NO.

Estudar a participação do óxido nítrico e dos canais para K^+ na resposta de relaxamento dependente do endotélio.

Verificar a participação dos canais BK_{Ca} e K_v na resposta de relaxamento independente do endotélio.

Analisar se o tratamento de sete dias com acetato de chumbo altera a liberação basal e estimulada de óxido nítrico nos anéis de aorta torácica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 250 e 300 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 052/2011).

4.1.1 Modelo Experimental

Os ratos foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Chumbo. Os animais do grupo Chumbo receberam diariamente, durante sete dias, injeções intramusculares (im.) de acetato de chumbo na face interna das patas traseiras, sendo a primeira dose de 4 µg/100 g e as doses subseqüentes de 0,05 µg/ 100 g/dia. Os animais do grupo Controle receberam diariamente injeção im. nas patas traseiras, de solução salina. Estudo prévio do nosso laboratório mostrou que esse tratamento atingiu uma concentração sanguínea de chumbo de 9,98 µg/dL ao final do tratamento (Fiorim *et al.*, 2011) (Figura VI).

Materiais e Métodos

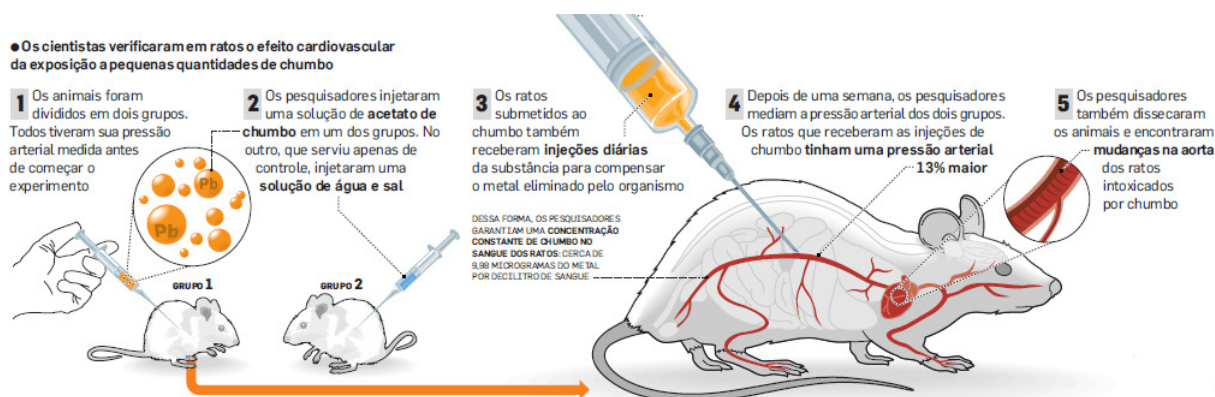


Figura VI: Modelo Experimental utilizado no presente estudo. Os ratos foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Chumbo. Os animais do grupo Chumbo receberam diariamente, durante sete dias, injeções intramusculares (im.) de acetato de chumbo, enquanto os animais do grupo Controle receberam diariamente injeção im. de solução salina (O Estado de São Paulo, 2011).

4.2 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Amental[®]) na dose de 50 mg/kg intraperitoneal e, em seguida, eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3,0 a 4 mm de comprimento (Figura VII).

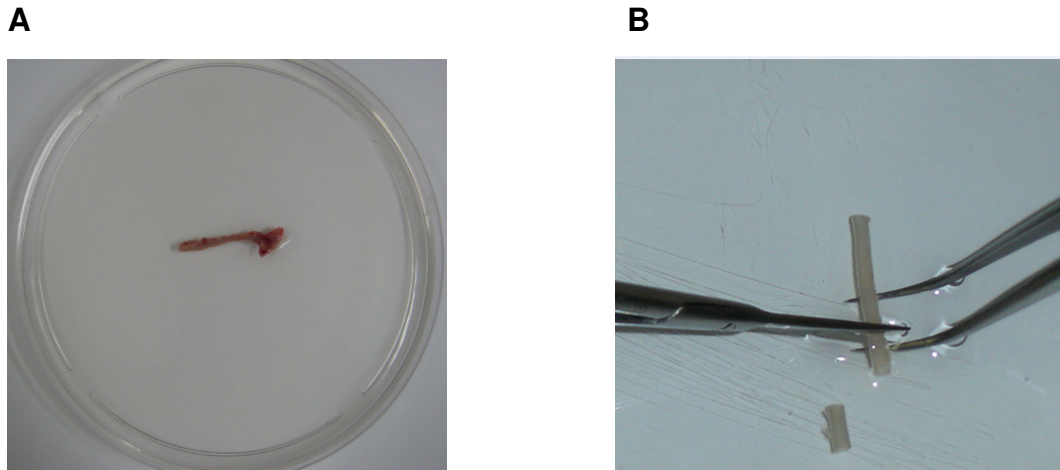


Figura VII: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 4 mm (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- USA) e este a um computador (Figura VIII).

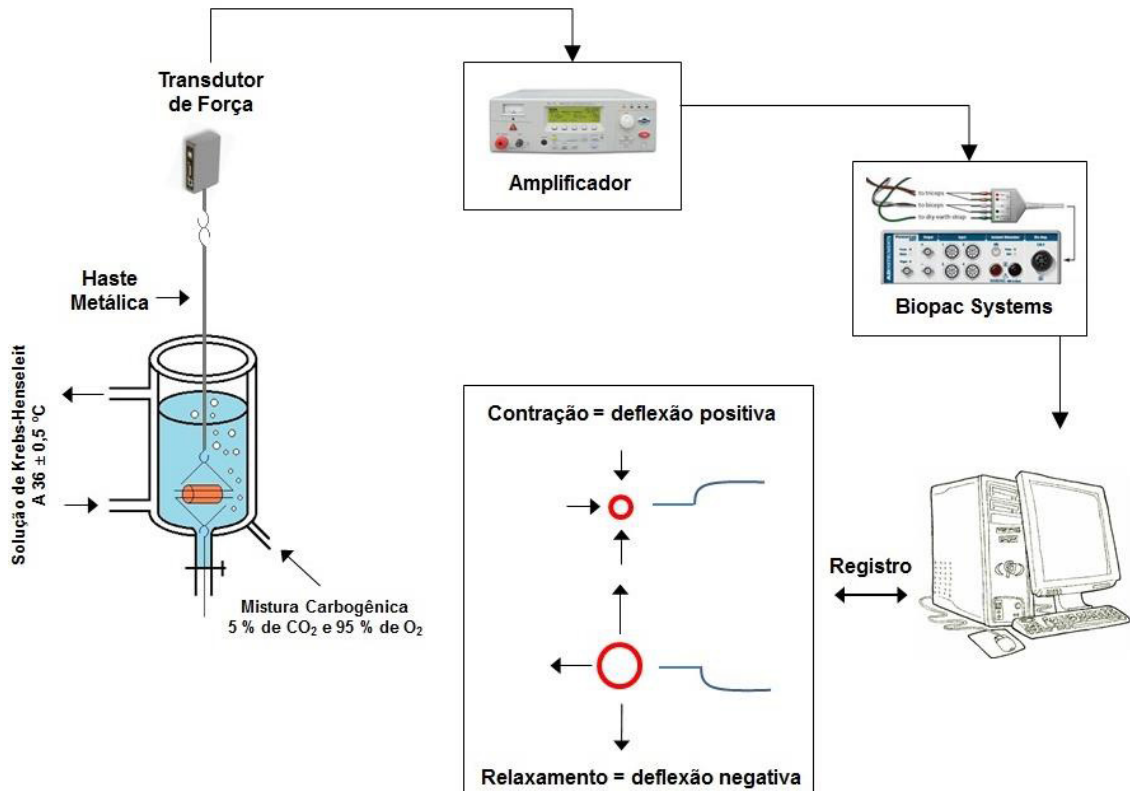


Figura VIII: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*” (Nunes, 2014).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 grama, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura IX A).

4.2.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura IX B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura IX D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no

registro da contração (Figura IX E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (1.0 grama) e, depois de 30 minutos (Figura IX G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

4.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (1 μ M). Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10 μ M) foi aplicada (Figura IX I, J, L). Os anéis que relaxaram menos que 80% do platô eram descartados.

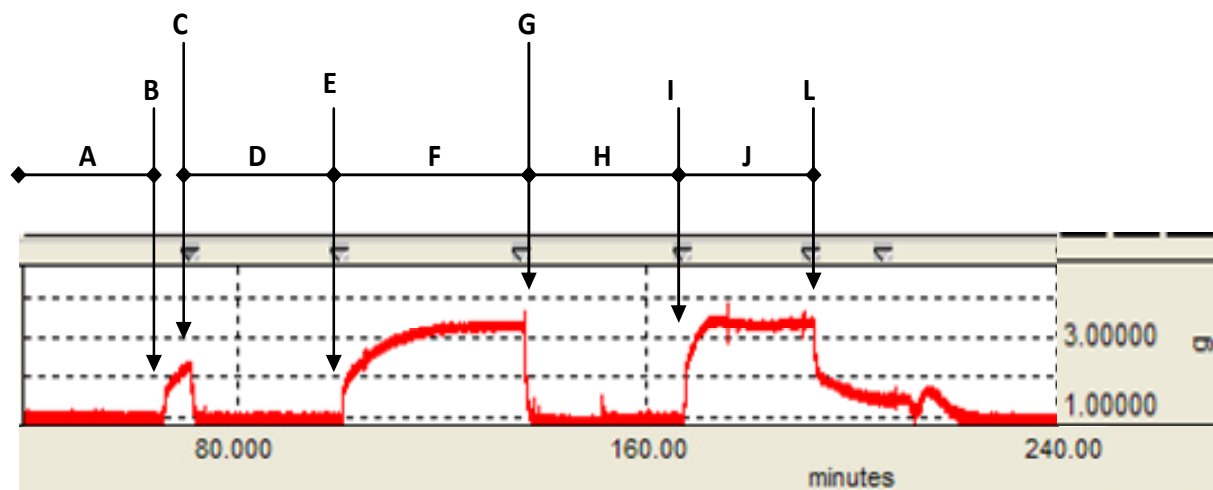


Figura IX: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 1 μ M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10 μ M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2011).

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritiva do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Após 30 minutos de estabilização e mais 30 minutos de incubação com fármacos, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados. O efeito do chumbo na resposta contrátil à fenilefrina, foi calculado como percentual de resposta ao KCl (75 mM).

4.3.2 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos, e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) (Figura X).

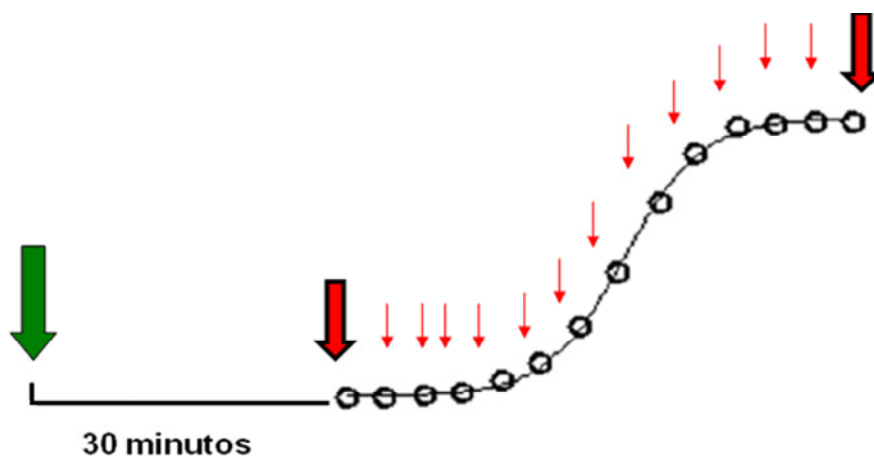


Figura X: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (0,1 nM – 0,3 mM) (Angeli, 2009).

4.3.2.1 Influência do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

4.3.2.2 Influência do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT_2 na resposta vasoconstritora à fenilefrina.

Buscando averiguar uma possível ativação dos receptores dos receptores AT_2 pela angiotensina II, os anéis de aorta dos grupos Controle e Chumbo foram incubados com um inibidor específico dos receptores AT_2 , o PD 123319 (1 μ M).

Posteriormente, para confirmar a hipótese que a angiotensina II, via receptores AT_2 , a estaria promovendo aumento da biodisponibilidade de NO nos

Materiais e Métodos

animais chumbo, foi realizado o protocolo de co-incubação de L-NAME (100 μ M) + PD 123319 (1 μ M).

4.3.3 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contráídos com fenilefrina (1 μ M). Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (0.1 nM-300 μ M).

4.3.3.1 Influencia do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a atividade funcional dos canais para potássio na resposta de relaxamento dependente do endotélio.

Para avaliar a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora a ACh, os anéis aórticos foram pré-contráídos com KCl (60 mmol/L).

Concentrações aumentadas de K^+ no meio extracelular promovem despolarização da membrana plasmática e abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (Berridge et al., 2003). O aumento da concentração de cálcio intracelular resulta na ativação da quinase da cadeia leve da miosina e fosforilação da miosina. Uma vez fosforilada, a miosina interage com os filamentos de actina, produzindo a contração (Somlyo e Somlyo, 2000). Como essa contração é dependente da despolarização da membrana, isso impede os canais para K^+ do MLV funcionem adequadamente, uma vez que o potencial de repouso das células se encontra menos negativo.

4.3.3.2 Influência do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica pré-contraída com fenilefrina ou com KCl (60 mmol/L).

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta vasodilatadora à ACh (em artéria pré-contraída com fenilefrina ou com KCl - 60 mmol/L), os anéis foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o *N*^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 µM).

4.3.3.3 Influência dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o tônus basal e a resposta de relaxamento dependente do endotélio.

Com a finalidade de estudar a participação dos subtipos de canais para K⁺ sobre o tônus basal e resposta vasodilatadora a ACh, os anéis foram incubados com tetraetilamônio (TEA, 2.0 mM), um inibidor não específico dos canais para K⁺, 4-aminopiridina (4-AP, 5mM), inibidor seletivo dos canais para K⁺ voltagem-dependente (K_v); Iberiotoxina (IbTx, 30nM), inibidor seletivo dos dos canais para K⁺ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}) e Apamina (0,5µM), inibidor seletivo dos canais para K⁺ ativados por cálcio de baixa condutância (SK_{Ca}).

4.3.4 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo na resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (1µM) e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta ao NPS em concentrações de 0.01 nM-0.3 µM.

Materiais e Métodos

4.3.4.1 Influência dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento independente do endotélio.

Para avaliar o efeito direto do NO sobre os canais para potássio do músculo liso vascular, os anéis foram incubados com Iberiotoxina (IbTx, 30nM), inibidor seletivo dos dos canais para K^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}) e 4-aminopiridina (4-AP, 5mM), inibidor seletivo dos canais para K^+ voltagem-dependente (K_v) e em seguida foi realizada curva de relaxamento ao NPS, um doador de NO.

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A MEDIDA DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO NOS ANÉIS DE AORTA TORÁCICA.

A liberação local de NO foi avaliada conforme o método descrito por Martín *et al.*, (2005). Para a realização desse protocolo, os anéis obtidos foram estabilizados durante 30 minutos em tampão HEPES (em mmol/L: NaCl 119; HEPES 20; $CaCl_2$ 1,2; KCl 4,6; $MgSO_4$ 1; KH_2PO_4 0,4; $NaHCO_3$ 5; glicose 5,5; NaH_2PO_4 0,15; pH 7,4) a 37° C. Depois do período de estabilização, os anéis dos grupos Controle e Chumbo foram incubados com o produto fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 μ mol/L, diluído em tampão HEPES) durante 30 minutos, a 37° C, e a solução foi coletada para medida da liberação basal de NO. Para medida da liberação de NO após estímulo, uma concentração de fenilefrina (1 μ M) e de ACh (10 μ M) foi aplicada em ambos os anéis, com o objetivo de mimetizar as mesmas condições dos experimentos conduzidos no estudo de reatividade vascular. Em seguida, a solução foi novamente coletada para a medida da liberação de NO.

A produção de NO foi estimada a partir da intensidade de fluorescência do DAF. A fluorescência da solução foi medida em temperatura ambiente usando um espectrofluorímetro (Biotek Sinergy™ 2 Instruments, Biotek's Gen 5™ Software), com filtros de excitação no comprimento de onda de 492 nm e de emissão no comprimento de onda de 515 nm. Para determinar a emissão basal de fluorescência do DAF, foi realizada a medida da fluorescência da solução sem a presença do anel

de aorta. A quantidade de óxido nítrico liberada foi expressa como unidades arbitrárias/mg de tecido.

4.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

As respostas contráteis ao KCl e à fenilefrina foram expressadas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, evocadas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contracção obtida pela fenilefrina.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e pD_2 ($-\log EC_{50}$, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina ou a resposta vasodilatadora à ACh ou ao NPS dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado, análise de variância (ANOVA), de uma via para medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando ANOVA apresentava significância estatística era realizado o *pos-hoc* de Tukey utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4.6 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetato de Chumbo
- Acetato de sódio (Sigma)
- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido hidroxietilpiperazina (HEPES) (Sigma)
- 4- Aminopiridina (Sigma)
- Apamina (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- 4,5-diaminofluoresceína (DAF) (Sigma)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Glicose (Merck)
- Iberiotoxina (Sigma)
- L-Fenilefrina, Hidrocloreto (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- N[□]-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- PD 123319 difluoroacetate, dihidratado (Sigma)
- Tetraetilamonio (TEA) (Sigma)
- Tiopental Sódico (Amental[®])
- Tris HCl (Sigma)

Todas as soluções usadas para a avaliação da reatividade vascular foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20º C.

5- RESULTADOS

5.1 VALORES DE MASSA CORPORAL

Os animais do grupo Controle e Chumbo apresentaram peso semelhante no início (Controle = 258 ± 1.39 g, n= 25; Chumbo = 260 ± 0.98 g, n=20; $p > 0,05$) e ao final do tratamento (Controle = 305 ± 2.88 g, n= 20; Chumbo = 307 ± 2.68 g, n=25; $p > 0,05$), sugerindo que o tratamento com acetato de chumbo, por sete dias, não teve influência no ganho de peso corporal.

5.2 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA

A exposição dos segmentos arteriais ao KCl (75 mM) promoveu resposta contrátil com magnitude semelhante nos dois grupos experimentais.

O número de animais mostrados na tabela 1 representa o n total dos animais utilizados em todos os protocolos experimentais submetidos à resposta contrátil ao cloreto de Potássio (KCl).

Tabela 1: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de ratos Wistar dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb).

Contração (g) KCl (75 mM)	
Ct	$3,48 \pm 0,08$ (n= 25)
Pb	$3,23 \pm 0,09$ (n= 25)

Valores expressos em média e EPM; Teste t não-pareado. $p > 0,05$.

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.

A fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos Controle e Chumbo (Figura 1). No entanto, a resposta máxima foi menor nos segmentos arteriais dos animais do grupo Chumbo (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Chumbo na sensibilidade (pD_2) à fenilefrina.

Tabela 2: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos Wistar dos grupos Controle (Ct) e Chumbo (Pb).

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Ct	90.79 ± 4.52	6.39 ± 0.10
Pb	$69.01 \pm 5.45^*$	6.27 ± 0.12

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não-pareado. * $p < 0,05$; $R_{m\acute{a}x}$: Ct vs Pb

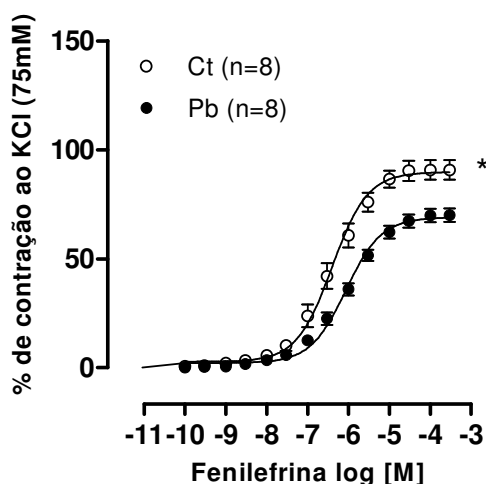


Figura 1: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos Controle (Ct) e Chumbo (Pb). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não-pareado. * $p < 0,05$ para $R_{\text{máx}}$: Ct vs Pb.

5.3.1 Efeito dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina nos aorta torácica

O resultado apresentado anteriormente mostrou que o tratamento com acetato de chumbo induz uma diminuição da resposta máxima à fenilefrina. Estudo prévio, utilizando o mesmo modelo experimental de tratamento por sete dias com chumbo, mostrou um aumento da modulação endotelial em resposta à fenilefrina no grupo chumbo (Fiorim *et al.*, 2011). Assim, para verificar a influência dos fatores endoteliais na resposta à fenilefrina, investigamos algumas vias de agentes vasoativos derivados do endotélio.

5.3.1.1 Participação do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Para avaliar se o tratamento com acetato de chumbo alterou a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, utilizou-se L-NAME (100 μ M), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase. O L-NAME provocou aumento da

R_{máx} e da pD₂ à fenilefrina nas artérias de ambos os grupos (Figuras 2 A e B) – (Tabela 2). No entanto, ao calcular a %dAUC foi possível observar que o aumento da reatividade à fenilefrina provocado pelo L-NAME ocorreu em maior magnitude no grupo chumbo (%dAUC Controle = 102.63 ± 16.82 vs. Chumbo = 191.78 ± 30.67, *p<0,05, Teste *t*) (Figura 2 C). Esses resultados sugerem um aumento na biodisponibilidade de NO no grupo exposto ao metal.

Tabela 3: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Chumbo , na presença e na ausência de L-NAME.

	R _{máx} (%)	pD ₂
Ct	90.79 ± 4.52	6.39 ± 0.10
Ct L-NAME	130.3 ± 2.96 [#]	7.60 ± 0.30 [#]
Pb	69.01 ± 5.45	6.27 ± 0.12
Pb L-NAME	146.2 ± 3.49 [*]	7.15 ± 0.14 [*]

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. [#]p<0,05; R_{máx} e pD₂: Ct vs Ct L-NAME
^{*}p<0,05; R_{máx} e pD₂: Pb vs Pb L-NAME.

Resultados

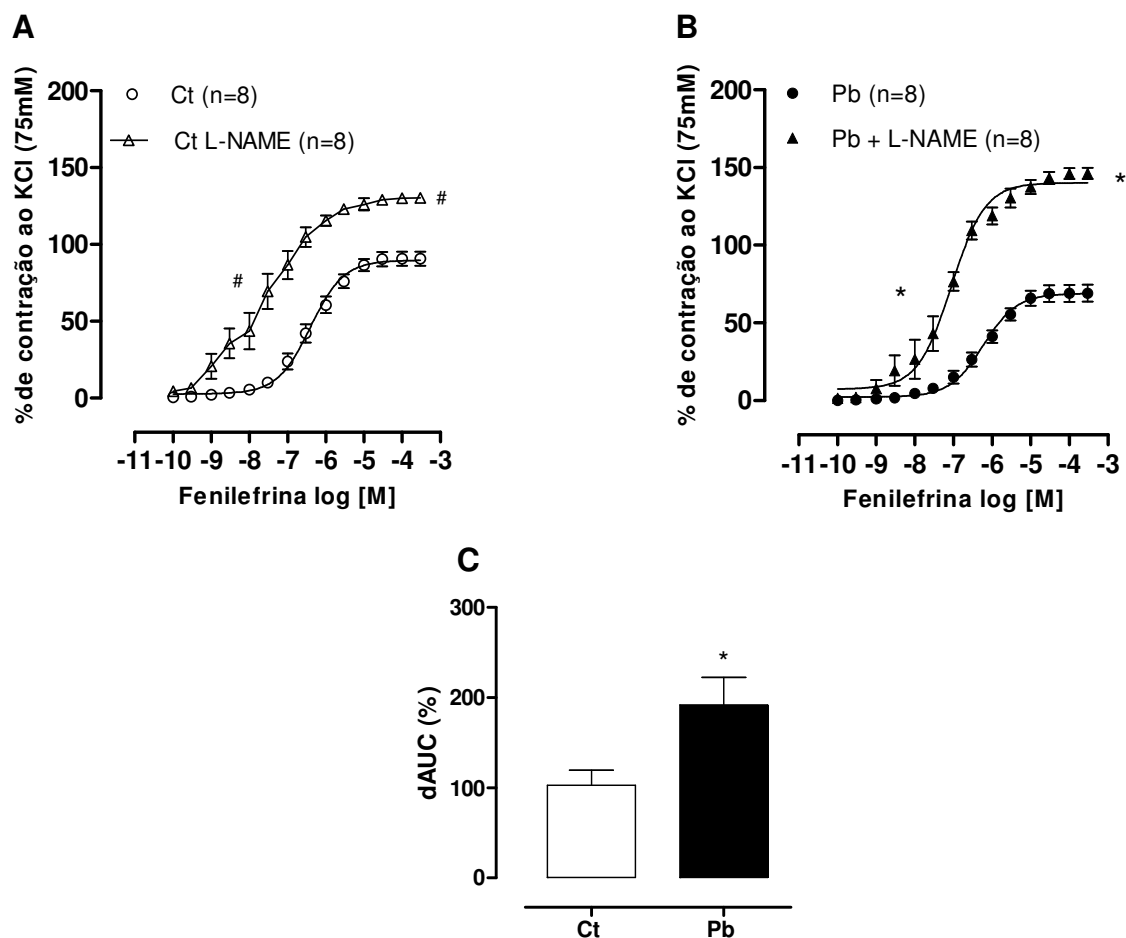


Figura 2: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (Ct) e após a incubação com L-NAME (L-NAME Ct); (B) Chumbo (Pb) e após a incubação com L-NAME (L-NAME Pb); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle (não-preenchido) e Chumbo (preenchido). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não-pareado. # $p < 0,05$ para Ct vs Ct L-NAME; * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ = Pb vs Pb L-NAME - e % dAUC - Ct vs Pb.

5.3.1.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT_2 .

Estudos prévios demonstram que a angiotensina II aumenta a biodisponibilidade de NO em de aorta torácica (Pueyo *et al*, 1998; Yayama *et al*, 2006). Considerando que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo aumentou a ECA plasmática (Fiorim *et al*, 2011), reduziu a reatividade vascular à

fenilefrina e aumentou a biodisponibilidade de NO, poderíamos supor que a angiotensina II, atuando via receptores AT₂, poderia estar envolvida no aumento da biodisponibilidade de NO nos animais chumbo. Assim, para investigar se existe maior interação da angiotensina II com os receptores do subtipo AT₂, os anéis aórticos foram incubados com PD 123319 (1 µM).

Na condição Controle o PD 123319 (1 µM) não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (Tabela 4; Figura 3 A). No entanto, na presença deste fármaco, houve um aumento da reatividade à fenilefrina no grupo Chumbo (Tabela 4; Figura 3 B), indicando maior interação da angiotensina II com os receptores AT₂. Dessa forma, a angiotensina II, via receptores AT₂, poderia estar envolvida no aumento da biodisponibilidade de NO nos animais tratados com acetato de chumbo.

Para confirmar essa hipótese, foi realizado o protocolo de co-incubação de L-NAME + PD 123319. Após a Co-incubação PD 123319 (1 µM) e L-NAME (100 µM) houve aumento da R_{máx} e da pD₂ à fenilefrina nas artérias de ambos os grupos (Figuras 4 A e B) – (Tabela 5). Ao calcular a %dAUC observou-se que o aumento da reatividade à fenilefrina provocado pelo L-NAME + PD 123319 foi similar nos dois grupos experimentais (%dAUC Ct L-NAME + PD = 97.56 ± 8.95 vs. Pb L-NAME + PD = 122.75 ± 9.55, p>0,05, Anova 1 via) (Figura 4 C). Portanto, a maior magnitude de resposta à fenilefrina após incubação com L-NAME no grupo chumbo (Figura 2 C), foi normalizada para níveis controle em presença de L-NAME + PD (Figura 4 C).

Em conjunto, os dados sugerem que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo aumentou a biodisponibilidade de NO via receptores AT₂.

Tabela 4: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo, na presença e na ausência de PD123319.

	R _{máx} (%)	pD ₂
Ct	90.79 ± 4.52	6.39 ± 0.10
Ct PD123319	87.93 ± 3.82	6.57 ± 0.14
Pb	69.01 ± 5.45	6.27 ± 0.12
Pb PD123319	92.93 ± 6.37*	6.52 ± 0.18

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. *p<0,05; R_{máx} : Pb vs Pb PD 12331

Resultados

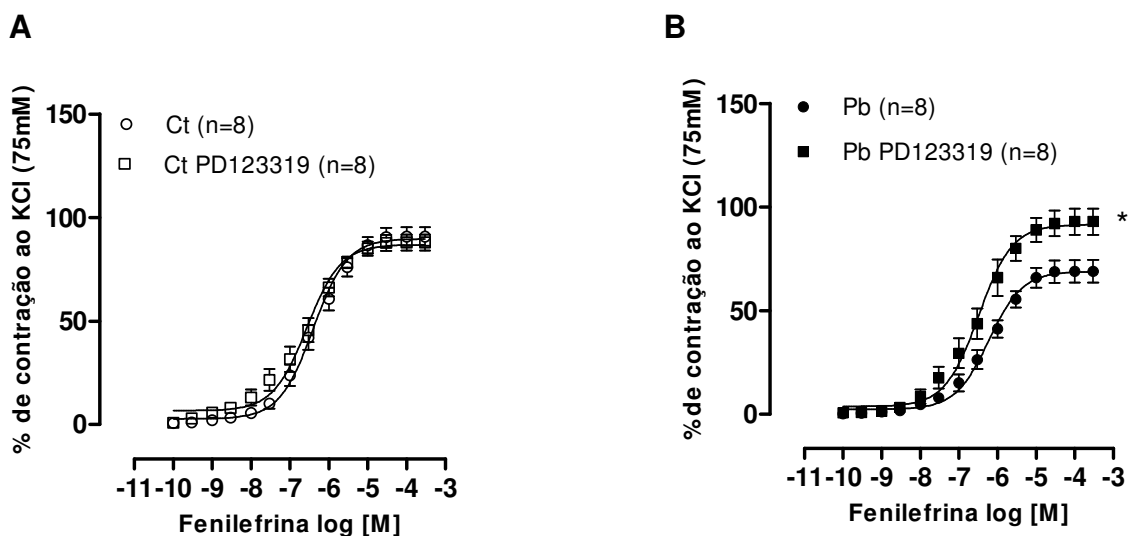


Figura 3: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (Ct) e após a incubação com PD123319 (Ct); (B) Chumbo (Pb) e após a incubação com PD123319 (Pb PD123319); O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t* não-pareado. $p > 0,05$ para $R_{\text{máx}}$ e pD_2 : Ct vs Ct PD123319; $*p < 0,05$ $R_{\text{máx}}$: Pb vs Pb PD123319.

Tabela 5: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Chumbo, na presença e na ausência de L-NAME + PD 123319.

	$R_{\text{máx}}$ (%)	pD_2
Ct	90.79 ± 4.52	6.39 ± 0.10
Ct L-NAME + PD	$127.1 \pm 4.47^{\#}$	$7.47 \pm 0.16^{\#}$
Pb	69.01 ± 5.45	6.27 ± 0.12
Pb L-NAME + PD	$120.0 \pm 8.88^*$	$7.20 \pm 0.11^*$

Valores expressos em média \pm EPM; Teste *t* não-pareado. $^{\#}p < 0,05$; $R_{\text{máx}}$: Ct vs Ct L-NAME + PD 123319.; $*p < 0,05$; $R_{\text{máx}}$: Pb vs Pb PD L-NAME+ 123319.

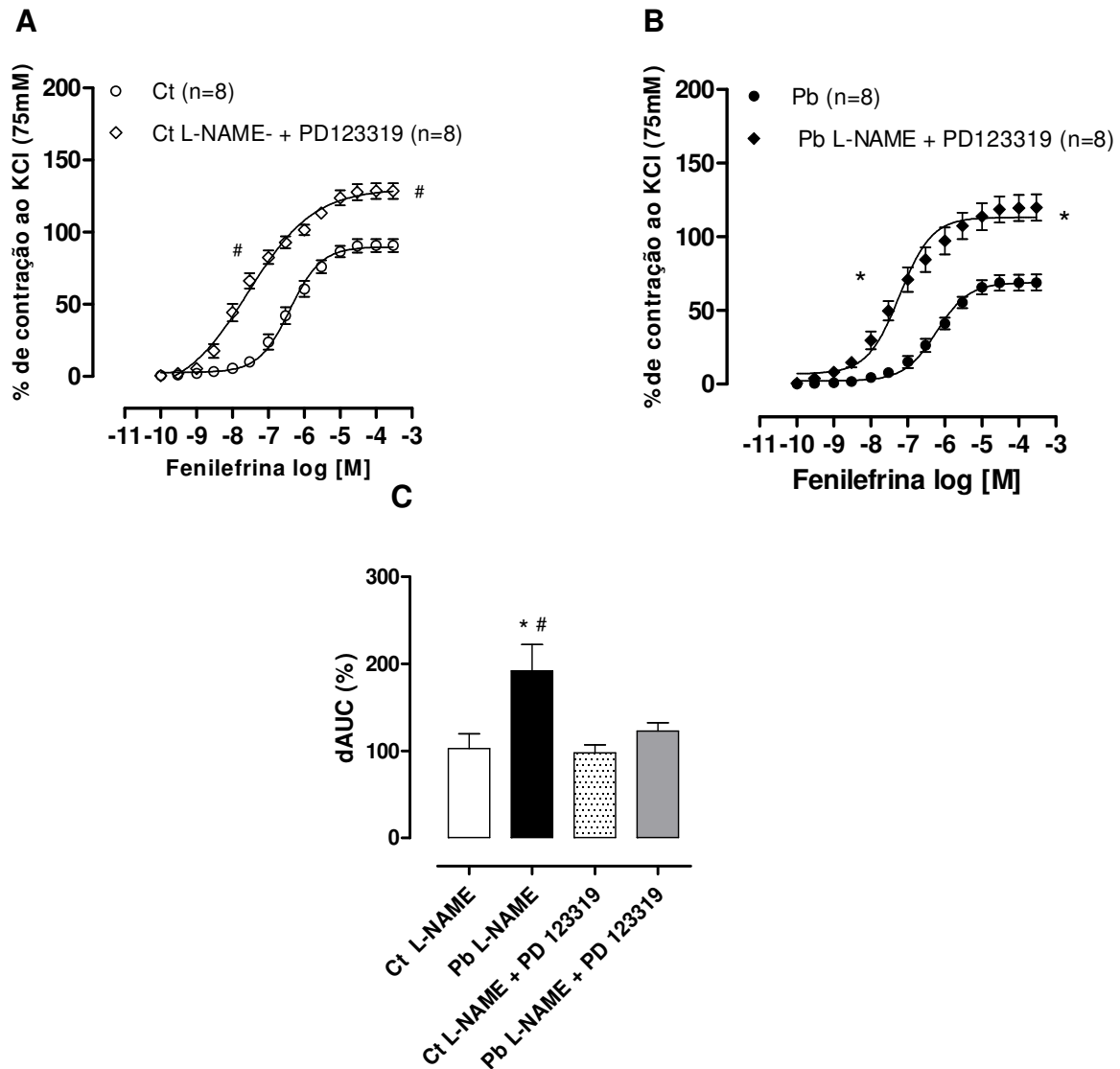


Figura 4: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar dos grupos: (A) Controle (Ct) e após a incubação com L-NAME + PD 123319 (Ct + L-NAME + PD123319); (B) Chumbo (Pb) e após a incubação com L-NAME + PD 123319 (Pb L-NAME + PD 123319); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle (não-preenchido e pontilhado) e Chumbo (preenchido e cinza). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não-pareado. # $p < 0,05$ para Ct vs Ct L-NAME + PD123319; * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ = Pb E⁺ vs Pb L-NAME + PD 123319 - e % dAUC, Anova 1 via. $p < 0,05$ para Ct L-NAME vs Pb L-NAME; # $p < 0,05$ para Pb L-NAME VS Pb L-NAME + PD123319.

Resultados

5.3.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta torácica.

Com base nos resultados funcionais apresentados anteriormente, a análise da liberação local de NO (condição basal e estimulada) foi realizada conforme o método descrito por Martín *et al.*, (2005). A Figura 5 (A e B) mostra maior liberação local de óxido nítrico no grupo chumbo. A presença de L-NAME e PD 123319 normalizou a liberação local de óxido nítrico nos animais tratados com chumbo.

Em conjunto, os dados funcionais e a liberação local de NO reforçam o envolvimento da angiotensina II, via receptores AT_2 , no aumento da biodisponibilidade de NO no grupo chumbo.

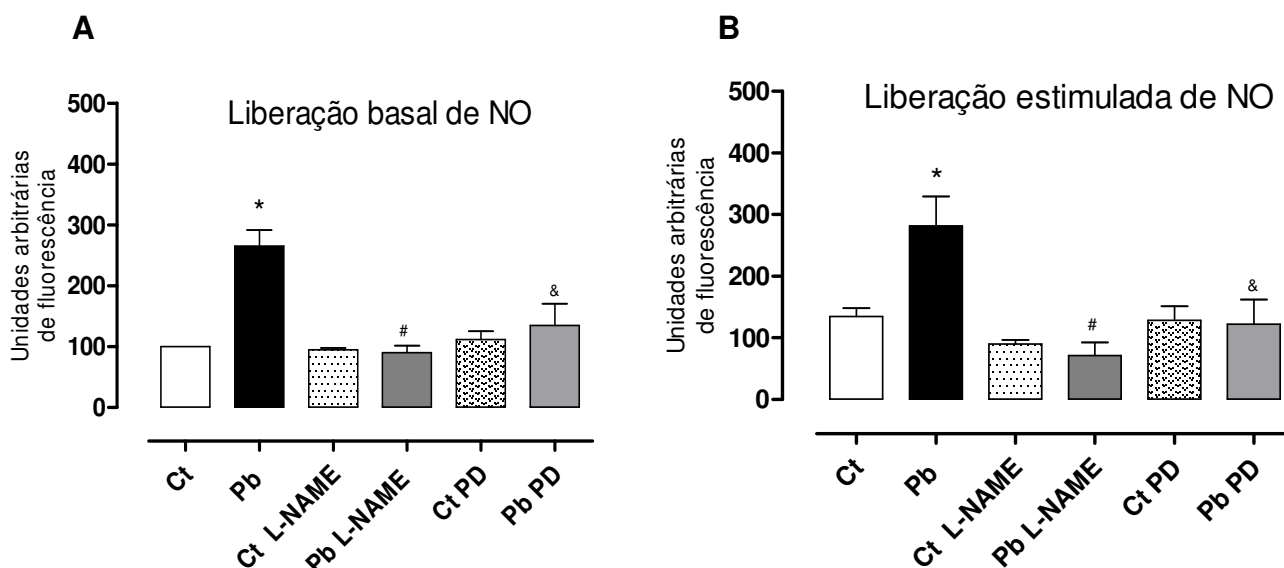


Figura 5: Liberação local de óxido nítrico (NO) na condição basal e estimulada com o uso de 5-diaminofluoresceína (DAF), em anéis de aorta de ratos controle (Ct; n=7, não preenchido) e tratados com acetato de chumbo (Pb; n=7; preenchidos). Os resultados, média \pm EPM, estão expressos em unidades arbitrárias/mg de tecido, calculados a partir da intensidade de fluorescência emitida pelo DAF. Anova 1 via. * $P < 0,05$ Ct vs Pb; # $P < 0,05$ Ct vs Pb L-NAME e & $P < 0,05$ Pb vs Pb PD.

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta à ACh. Não foram observadas diferenças no relaxamento à ACh entre os dois grupos experimentais (Tabela 6; Figura 6).

Tabela 6: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.

	$R_{\text{máx}}$ (%)	pD_2
Ct	99.91 ± 0.09	7.12 ± 0.13
Pb	99.80 ± 0.10	7.11 ± 0.09

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não-pareado. $p > 0,05$.

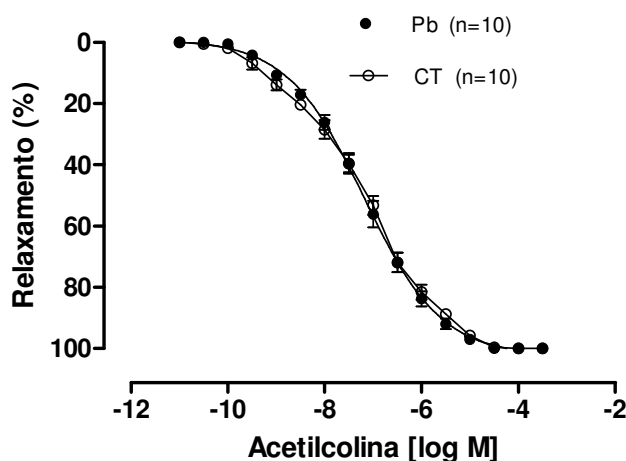


Figura 6: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t não-pareado. $p > 0,05$.

Resultados

5.4.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a atividade funcional dos canais para potássio nos anéis isolados de aorta.

Para avaliar a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora a ACh, os anéis aórticos foram pré-contraídos com KCl (60 mmol/L). Em artérias pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), o relaxamento induzido pela ACh foi reduzido em ambos os grupos experimentais (comparar Figura 6), demonstrando que parte do relaxamento induzido pela ACh pode envolver a ativação de canais para potássio. Entretanto, essa redução do relaxamento a ACh foi mais evidente nos animais tratados com acetato de chumbo, sugerindo maior participação dos canais para K^+ neste grupo experimental (Tabela 7; Figura 7).

Tabela 7: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com KCl (60 mmol/L).

	$R_{\text{máx}}$ (%)	pD_2
Ct	56.14 ± 2.83	5.76 ± 0.16
Pb	$25.87 \pm 3.29^*$	5.36 ± 0.40

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não-pareado. $^*p < 0,05$; $R_{\text{máx}}$: Ct vs Pb.

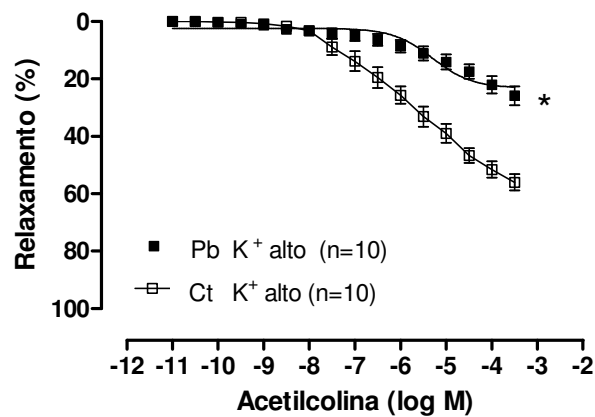


Figura 7: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), pré-contraídos com KCl (60mmol/L). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção KCl (60mmol/L). Teste *t* não-pareado. * $p \leq 0,05$ Rmáx: Ct vs Pb.

5.4.1.1 Participação do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica pré-contraída com fenilefrina ou com KCl (60 mmol/L).

Para avaliar se o tratamento com acetato de chumbo alterou a participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento induzido pela ACh, em artérias pré-contraídas com fenilefrina ou com KCl (60 mmol/L), utilizou-se L-NAME (100 μ M). Após incubação com L-NAME, o relaxamento induzido pela ACh foi abolido em artérias de ambos os grupos, pré-contraídas com fenilefrina (Fe - 1 μ M) ou com KCl (60 mmol/L) (Tabela 8; Figura 8), sugerindo que o NO é o mediador do relaxamento à ACh e parte deste relaxamento pode dever-se à ativação de canais para potássio pelo NO.

Resultados

Tabela 8: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), na presença e na ausência de L-NAME. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina ou com KCl (60 mmol/L).

	Pré-contracção Fe		Pré- contracção KCl	
	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂
Ct	99.91 ± 0.09	7.12 ± 0.13	56.14 ± 2.83	5.76 ± 0.16
Pb	99.80 ± 0.10	7.11 ± 0.09	25.97 ± 3.29 ^{&}	5.36 ± 0.40
Ct L-NAME	6.91 ± 3.51 [#]	7.14 ± 0.58	0.99 ± 0.26 [#]	6.67 ± 0.50
Pb L-NAME	6.91 ± 2.86 [*]	7.19 ± 0.09	1.30 ± 0.71 [*]	6.64 ± 1.53

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. [&]p<0,05; R_{máx}: Ct vs Pb, [#]p<0,05; R_{máx}: Ct vs Ct L-NAME, ^{*}p<0,05; R_{máx}: Pb vs Pb L-NAME.

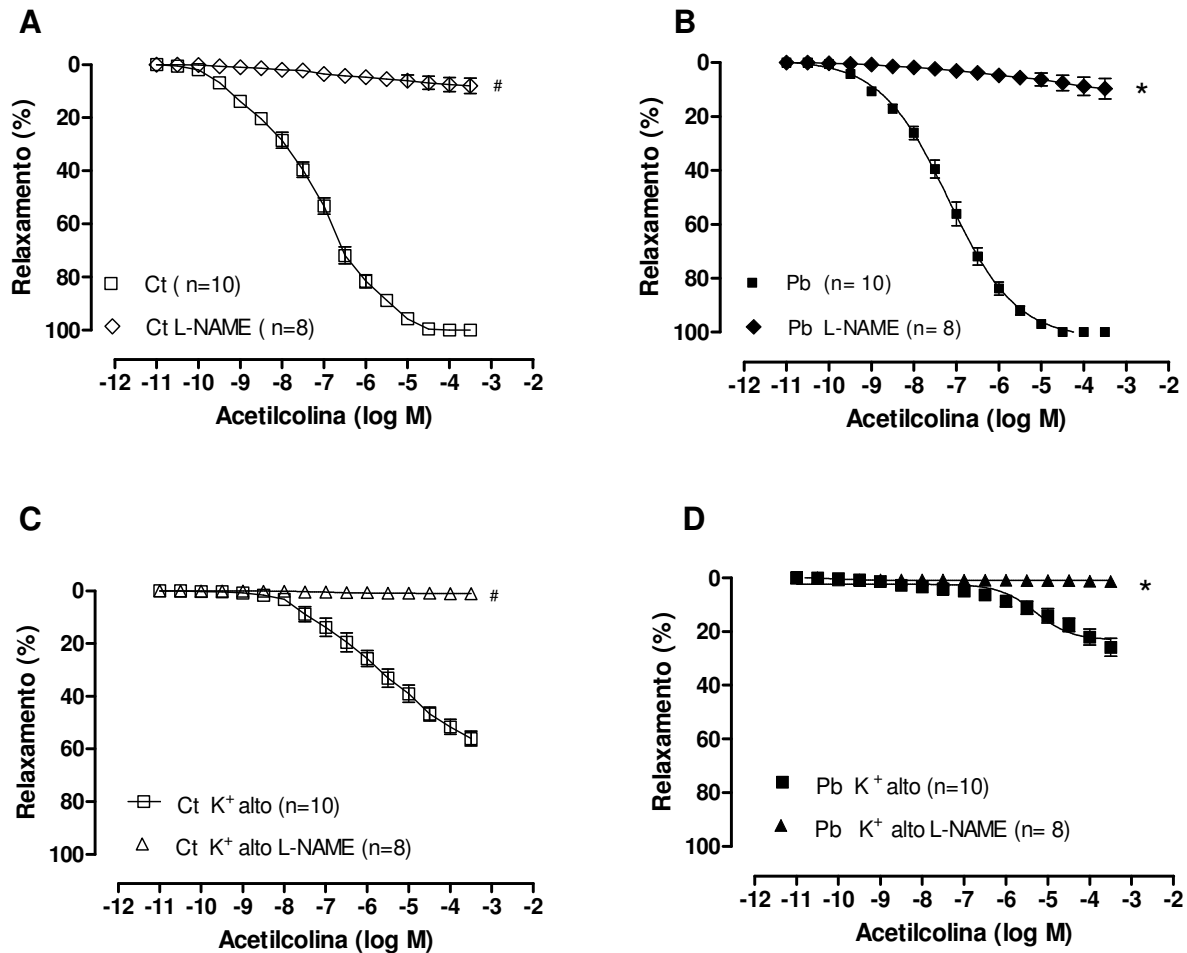


Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e após a incubação com L-NAME (Ct L-NAME); e Chumbo (Pb) e após a incubação com L-NAME (Pb L-NAME), pré-contraídos com fenilefrina (A,B) e com KCl (60mmol/L) (C,D). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção KCl (60mmol/L). Teste *t* não-pareado. #*p* ≤ 0,05 Rmáx: Ct vs Ct L-NAME; **p* ≤ 0,05 Rmáx: Pb vs Pb L-NAME.

5.4.1.2 Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o tônus basal e o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica.

Para estudar a influência dos subtipos de canais para potássio sobre o tônus basal e o relaxamento induzido pela ACh em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Chumbo, foi realizada uma sequência de experimentos de reatividade vascular após incubação dos anéis aórticos com TEA (2mM, inibidor não seletivo dos canais para K⁺); 4-aminopiridina (4-AP, 5mM, inibidor seletivo dos K_v);

Resultados

Iberiotoxina (IbTx, 30nM, inibidor seletivo dos BK_{Ca}) e Apamina (0,5 μ M, inibidor seletivo dos SK_{Ca}).

Os inibidores TEA e a 4-AP aumentaram o tônus basal em aortas de ambos os grupos experimentais, mas esses efeitos foram maiores nos animais chumbo (Figura 9 A), sugerindo um papel relevante dos canais K_v no controle do tônus arterial. Além disso, esses inibidores reduziram o relaxamento à ACh em aortas dos grupos Controle e Chumbo (Figura 9 B-C e E-F). Entretanto, esses efeitos ocorreram em maior magnitude nos animais chumbo, conforme demonstrado através da área abaixo da curva (%dAUC Controle TEA = 32.61 ± 3.86 e Chumbo TEA = 60.46 ± 4.17 , $p < 0,05$; Controle 4-AP = 30.89 ± 6.06 e Chumbo 4-AP = 55.78 ± 4.82 , $p < 0,05$) (Figura 9 D e G). Esses resultados indicam maior contribuição dos canais para K^+ , especialmente dos canais K_v , no tônus basal e no relaxamento induzido pela ACh nos animais Chumbo.

Para avaliar a participação canais para potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) no tratamento por sete dias com acetato de chumbo, os anéis de aorta foram incubados com IbTx e Apamina. Apenas a IbTx aumentou o tônus basal em aortas do grupos Controle e Chumbo, mas o efeito foi semelhante em ambos os grupos estudados (9 18 A). Além disso, esses dois inibidores reduziram o relaxamento à ACh em aortas de ambos grupos experimentais (Tabela 9, Figura 10 A-B e D-E). No entanto, esses efeitos ocorreram em maior magnitude no grupo chumbo, conforme demonstrado através da área abaixo da curva (%dAUC Controle IbTX = 22.60 ± 2.77 e Chumbo IbTX = 34.06 ± 3.35 , $p < 0,05$; Controle AP= 8.67 ± 1.38 e Chumbo AP = 23.74 ± 2.11 , $p < 0,05$) (Figura 10 C e F). Em conjunto, os dados sugerem uma maior participação dos canais BK_{Ca} e SK_{Ca} no relaxamento induzido pela ACh no grupo Chumbo.

Tabela 9: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), na presença e na ausência de TEA, 4-AP, IbTx e Apamina. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina.

	R _{máx} (%)	pD ₂
TEA		
Ct	99.91 ± 0.09	7.12 ± 0.13
Ct TEA	71.90 ± 2.47 [#]	6.62 ± 0.12 [#]
Pb	99.80 ± 0.10	7.11 ± 0.09
Pb TEA	59.69 ± 3.16 [*]	5.72 ± 0.31 [*]
4-AP		
Ct	99.91 ± 0.09	7.12 ± 0.13
Ct 4-AP	88.84 ± 3.03 [#]	6.45 ± 0.22 [#]
Pb	99.80 ± 0.10	7.11 ± 0.09
Pb 4-AP	54.03 ± 2.46 [*]	6.72 ± 0.52
IbTx		
Ct	99.91 ± 0.09	7.12 ± 0.13
Ct IbTx	94.14 ± 2.48 [#]	6.40 ± 0.18 [#]
Pb	99.80 ± 0.10	7.11 ± 0.09
Pb IbTx	81.43 ± 4.36 [*]	6.44 ± 0.18 [*]
AP		
Ct	99.91 ± 0.09	7.12 ± 0.13
Ct Apamina	91.65 ± 2.22 [#]	6.87 ± 0.09
Pb	99.80 ± 0.10	7.11 ± 0.09
Pb Apamina	91.47 ± 2.23 [*]	6.45 ± 0.07 [*]

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. [#]p<0,05; R_{máx}: Ct vs Pb, [#]p<0,05; R_{máx}: Ct vs Ct TEA, Ct vs Ct 4-AP, Ct vs Ct IbTx e Ct vs Ct Apamina ou ^{*}p<0,05; R_{máx}: Pb vs Pb TEA, Pb vs Pb 4-AP, Pb vs Pb IbTx, Pb vs Pb Apamina.

Resultados

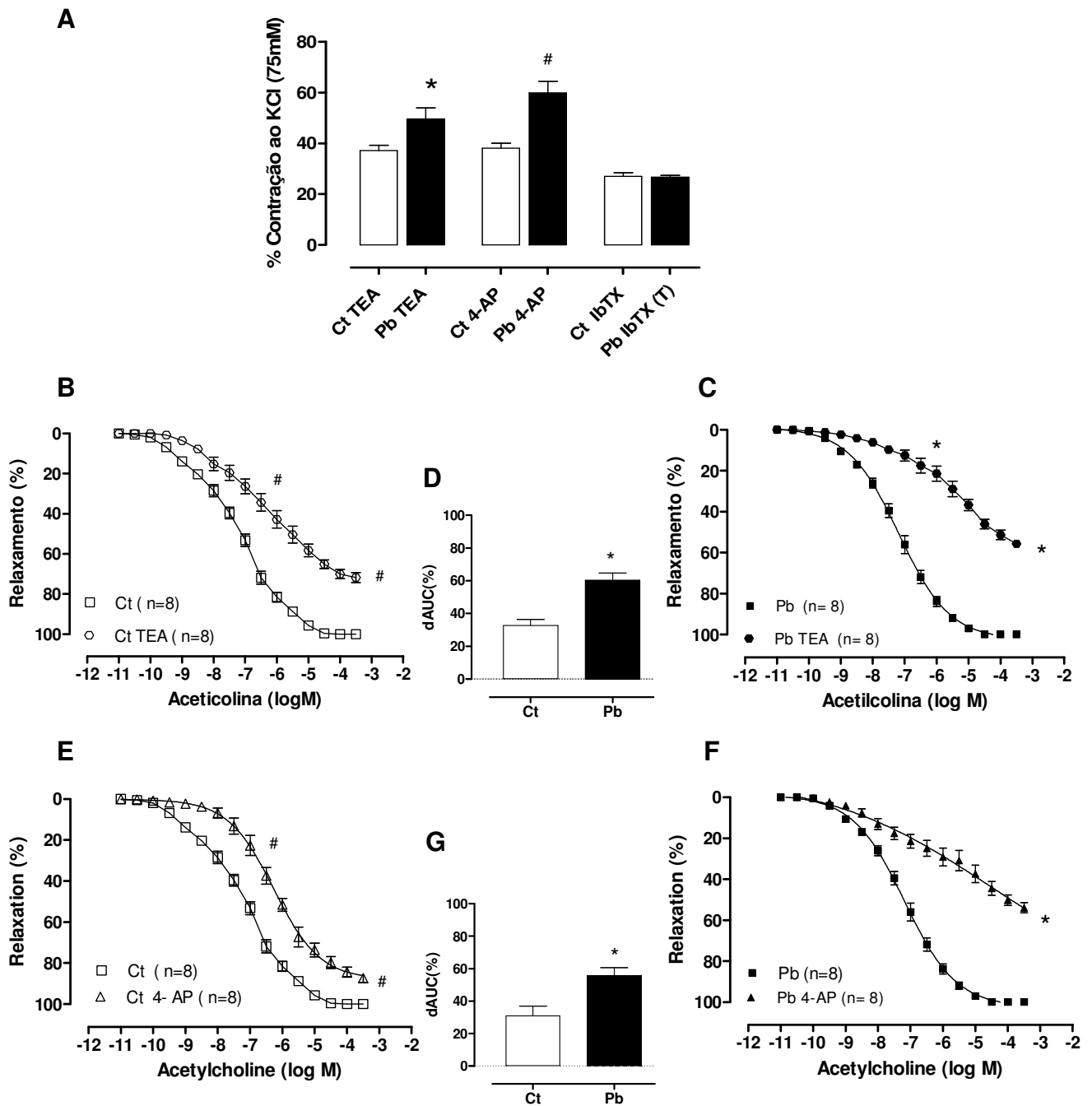


Figura 9: Influência dos canais para potássio sobre o tônus basal (A) e curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct - não preenchido) e após a incubação com TEA (Ct TEA) (B) e 4-AP (Ct 4-AP) (E); e Chumbo (Pb - preenchido) e após a incubação com TEA (Pb TEA)(C) e 4-AP (Pb 4-AP) (F). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste *t* não-pareado. # $p \leq 0,05$ Rmáx: Ct vs Ct TEA; Ct vs Ct 4-AP; * $p \leq 0,05$ Rmáx: Pb vs Pb TEA; Pb vs Pb 4-AP. % dAUC, Teste *t*. * $p < 0,05$ para Ct vs Pb (D, G).

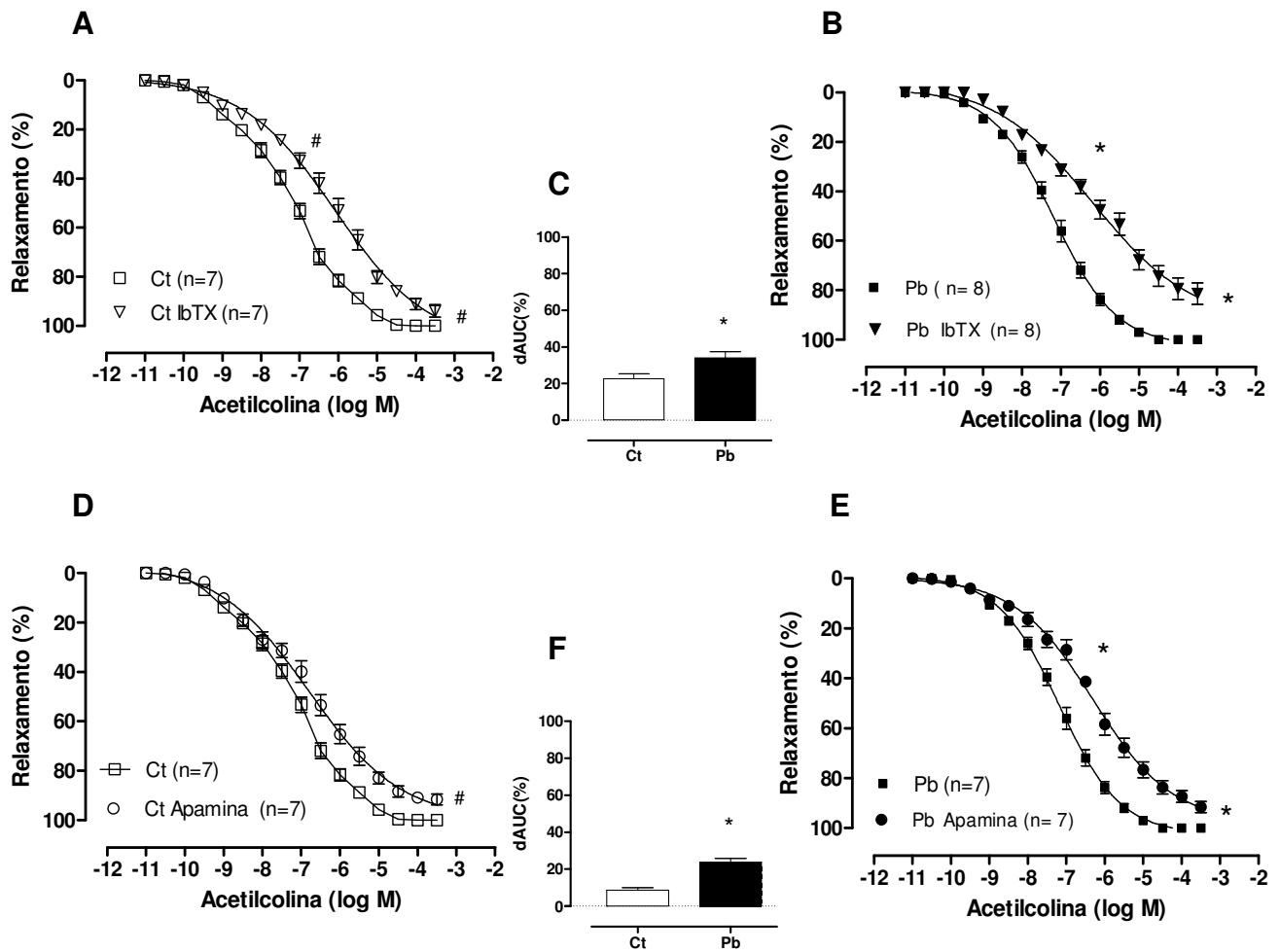


Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e após a incubação com IbTX (Ct IbTX) (A) e Apamina (Ct AP) (D); e Chumbo (Pb) e após a incubação com IbTX (Pb IbTX) (B) e Apamina (Pb AP) (E). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste *t* não-pareado. # $p \leq 0,05$ Rmáx: Ct vs Ct IbTX; Ct vs Ct Apamina; * $p \leq 0,05$ Rmáx: Pb vs Pb IbTX; Pb vs Pb Apamina. % dAUC, Teste *t*. * $p < 0,05$ para Ct vs Pb (C, F).

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do efeito induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). A resposta ao relaxamento induzida pelo NPS não foi diferente nos grupos estudados. Nenhuma alteração

Resultados

estatisticamente significativa foi observada nos valores de $R_{\text{máx}}$ e pD_2 ao NPS desses grupos (Tabela 10; Figura 11)

Tabela 10: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.

	$R_{\text{máx}}$ (%)	pD_2
Ct	99.90 ± 0.10	7.49 ± 0.07
Pb	99.96 ± 0.10	7.37 ± 0.06

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não-pareado. $p > 0,05$.

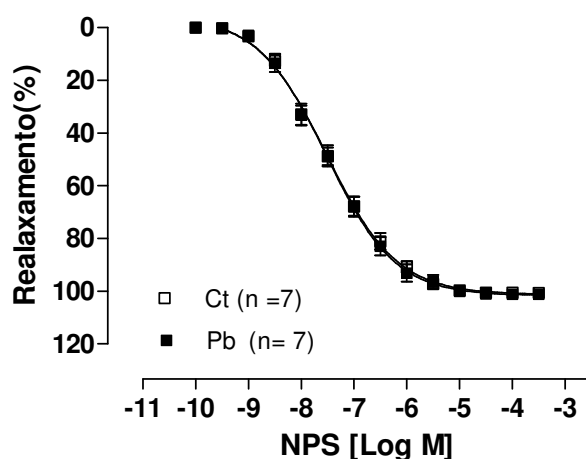


Figura 11: Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t não-pareado. $p > 0,05$.

5.5.1 Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aorta torácica.

Para avaliar o efeito direto do NO sobre os canais para potássio do músculo liso vascular, os anéis aórticos foram incubados com Iberiotoxina (IbTx, 30nM, inibidor seletivo dos BK_{Ca}) e 4-aminopiridina (4-AP, 5mM, inibidor seletivo dos K_v) e em seguida foi realizada curva de relaxamento ao NPS, um doador de NO.

Os inibidores IbTX e 4-AP reduziram o relaxamento ao NPS em aortas dos grupos Controle (Tabela 11, Figura 12 A - D) e Chumbo (Tabela 11, Figura 12 B e E). Entretanto, esses efeitos ocorreram em maior magnitude nos animais chumbo, conforme demonstrado através da área abaixo da curva (%dAUC; Controle IbTX = 16.45 ± 2.35 e Chumbo IbTX = 25.97 ± 2.72 , $p < 0,05$; Controle 4-AP = 12.45 ± 3.86 e Chumbo 4-AP = 27.90 ± 3.99 , $p < 0,05$) (Tabela 11, Figura 12 C e F). Esses achados sugerem maior participação dos canais BK_{Ca} e K_v no relaxamento induzido pelo NPS no grupo Chumbo.

Tabela 11: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle (Ct) e Chumbo (Pb), na presença e na ausência de IbTx e 4-AP. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.

	R _{máx} (%)	pD ₂
Ct	99.90 ± 0.10	7.49 ± 0.07
Ct IbTX	99.47 ± 0.83	$6.35 \pm 0.10^{\#}$
Ct 4-AP	$93.26 \pm 2.04^{\#}$	$6.77 \pm 0.17^{\#}$
Pb	99.96 ± 0.10	7.37 ± 0.06
Pb IbTX	$91.50 \pm 2.20^*$	$6.57 \pm 0.10^*$
Pb 4-AP	$89.01 \pm 2.39^*$	$6.55 \pm 0.16^*$

Valores expressos em média \pm EPM; Teste *t* não-pareado. [#] $p < 0,05$; R_{máx}: Ct vs Ct 4-AP, ^{*} $p < 0,05$; R_{máx}: Pb vs Pb IbTx e Pb vs Pb 4-AP.

Resultados

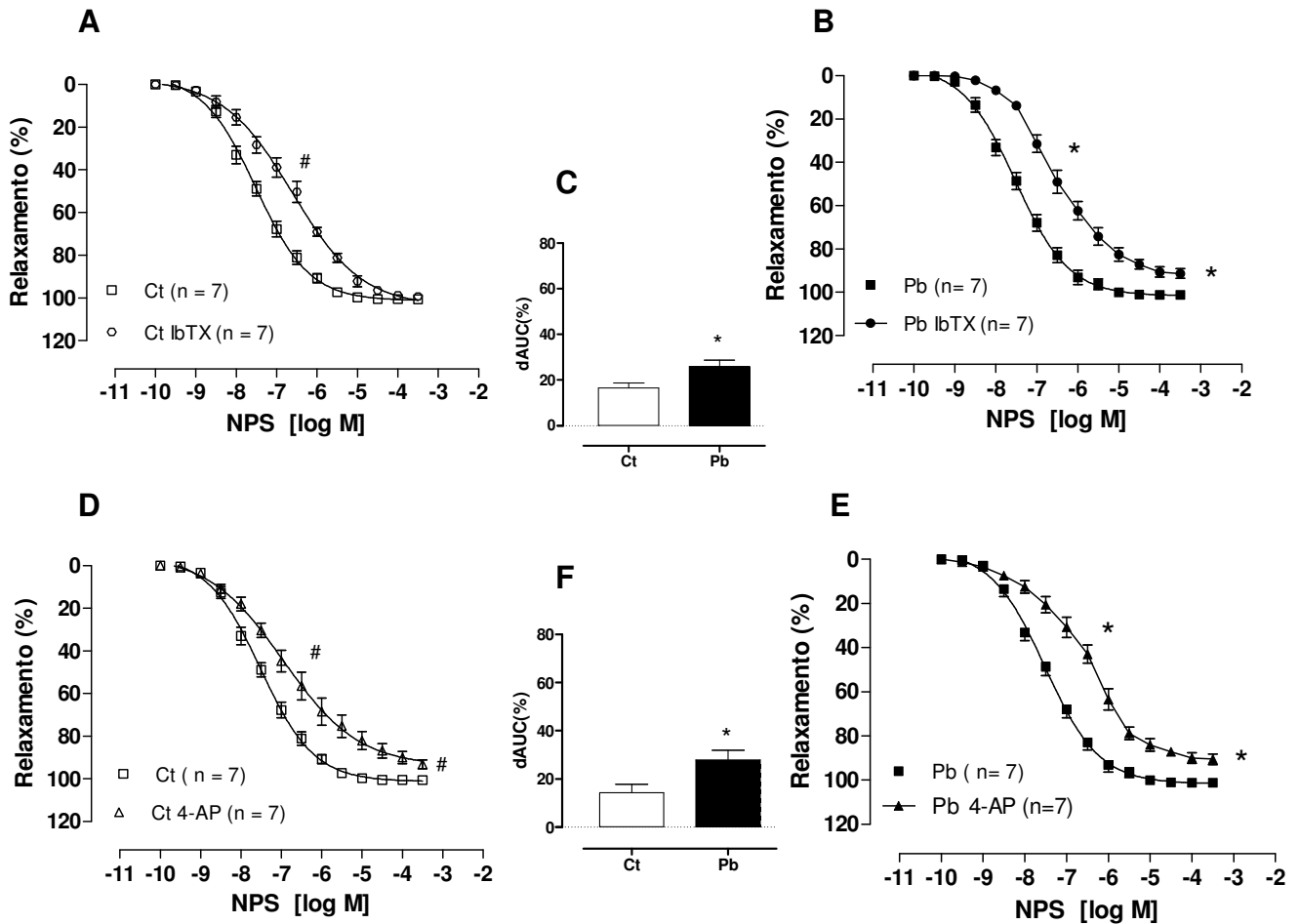


Figura 12: Curvas concentração-resposta ao NPS em anéis de aorta de ratos dos grupos: Controle (Ct) e após a incubação com IbTX (Ct IbTX) (A) e 4-AP (Ct 4-AP) (D); e Chumbo (Pb) e após a incubação com IbTX (Pb IbTX) (B) e 4-AP (Pb 4-AP) (E). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste *t* não-pareado. # $p \leq 0,05$ Rmáx: Ct vs Ct 4-AP; * $p \leq 0,05$ Rmáx: Pb vs Pb IbTX; Pb vs Pb 4-AP. % dAUC, Teste *t*. * $p < 0,05$ para Ct vs Pb (C, F).

6- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram os efeitos do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. A exposição ao chumbo, mesmo em baixa concentração sanguínea ($\sim 10\mu\text{g/dL}$), foi capaz de alterar o funcionamento dessa importante artéria de condutância, reduzindo a reatividade à fenilefrina. Esta resposta é endotélio-dependente e decorrente do aumento da biodisponibilidade de NO. O presente estudo mostrou também envolvimento dos receptores AT_2 neste aumento de biodisponibilidade de NO.

Além disso, sabendo que o NO induz a vasodilatação através de diferentes vias, incluindo a ativação de canais para K^+ , nossos resultados sugerem maior participação dos canais K_v e BK_{Ca} no controle do tônus vascular e no relaxamento induzido pela ACh e ao NPS em aortas de ratos do grupo chumbo.

Com intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta promovida pelo chumbo sobre a redução da reatividade vascular em anéis isolados aorta, aumento da biodisponibilidade de NO e ativação dos canais para K^+ , os resultados encontrados neste trabalho serão discutidos adiante.

6.1 CHUMBO: FATOR DE RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES

O chumbo é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em humanos (Vupputuri *et al.*, 2003; Menke *et al.*, 2006; Navas-Acien *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Healey *et al.*, 2009; Yazbeck *et al.*, 2009) e em experimentos animais (Fiorim *et al.*, 2011, 2012; Simões *et al.*, 2011, 2015; Fioresi *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2010, 2014). A exposição ao chumbo está relacionada com aumento da pressão arterial (Fiorim *et al.*, 2011; Fioresi *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2011; 2015) e alterações vasculares, como o aumento (Silveira *et al.*, 2010, 2014; Simões *et al.*, 2015) ou a diminuição da reatividade vascular à FE (Fiorim *et al.*, 2011, 2012).

O efeito tóxico desse metal está relacionado com aumento da atividade da ECA plasmática (Fiorim *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2014), da

Discussão

atividade funcional da Na⁺/K⁺ ATPase (Fiorim *et al.*, 2011; 2012) e da ativação dos canais para K⁺ (Fiorim *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2014). Além disso, o chumbo promove alterações na via do óxido nítrico, aumentando (Fiorim *et al.*, 2011, 2012) ou diminuindo a biodisponibilidade de NO (Silveira *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015).

Estudo prévio do nosso laboratório, utilizando o mesmo modelo experimental de administração controlada de chumbo, em baixa concentração, por sete dias atingiu uma concentração sanguínea de 9,98 µg/dL. Esse valor é muito inferior aos valores considerados limites pelas agências de toxicovigilância. No entanto, essa concentração sanguínea de chumbo foi suficiente para elevar os níveis de pressão arterial sistólica (PAS), diminuir a reatividade vascular à fenilefrina e aumentar a biodisponibilidade de NO em aorta de ratos (Fiorim *et al.*, 2011).

Mediante estas informações, a importância desse estudo reside no fato de tornar mais conhecido o efeito da exposição por sete dias à baixa concentração de chumbo (9,98 µg/dL) sobre o sistema cardiovascular, mais especificamente sobre a artéria aorta. Dessa maneira, o presente estudo nos permitiu esclarecer por qual via o acetato de chumbo poderia aumentar a biodisponibilidade de NO e assim, diminuir a resposta à fenilefrina em aorta de ratos. Além disso, o estudo analisou também se o NO poderia induzir vasodilatação através de uma maior ativação dos canais para K⁺ nos animais do grupo chumbo.

Com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta promovida pelo acetato de chumbo, os resultados encontrados serão discutidos minuciosamente em cada protocolo realizado neste trabalho.

6.2 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

As células do músculo liso vascular dependem diretamente de um aumento na concentração de cálcio citoplasmático para deflagrar sua contração, como na presença de agentes vasoconstritores que se ligam a receptores específicos (agonistas α₁ adrenérgico: fenilefrina e noradrenalina) (Horowitz *et al.*, 1996), assim

como a despolarização da membrana induzida, por exemplo, pelo aumento da concentração de potássio extracelular (Ganitkevich e Isenberg, 1991).

Concentrações aumentadas de K^+ no meio extracelular promovem despolarização da membrana plasmática e abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (Berridge *et al.*, 2003). O aumento da concentração de cálcio intracelular resulta na ativação da quinase da cadeia leve da miosina e fosforilação da miosina. Uma vez fosforilada, a miosina interage com os filamentos de actina, produzindo a contração (Somlyo e Somlyo, 2000).

Já os agonistas, ligam-se a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína G, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) que hidrolisa a fosfatidilinositol bifostato (PIP_2), resultando em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, enquanto que o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) resultando em maior mobilização de cálcio através de canais da membrana. Todos esses mecanismos aumentam a concentração intracelular de cálcio (Blaustein e Hamlyn, 2010).

Inicialmente, nosso estudo avaliou a resposta à fenilefrina em aorta de ratos do grupo controle e chumbo. Observou-se que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo promoveu uma diminuição, concentração dependente, da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta, confirmada pela diminuição da resposta máxima. Resultado semelhante foi encontrado por Nunes *et al.*, (2014) em anéis de aorta de ratos Wistar, expostos a 100 ppm de acetato de chumbo em água de beber por 30 dias.

Em contrapartida, estudo prévio realizado por Silveira *et al.*, (2014), utilizando o mesmo modelo de exposição controlada ao acetato de chumbo, por 30 dias, mostrou que a exposição ao metal aumentou a resposta máxima à fenilefrina em aorta torácica de ratos. Heydari *et al.*, (2006), documentaram que o chumbo (100 ppm em água de beber) foi capaz de aumentar a resposta máxima e a sensibilidade na presença de fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos tratados com chumbo por um período de 8 a 12 semanas, sendo que esses valores foram mais expressivos no grupo tratado por oito semanas.

Por outro lado, Karimi *et al.*, (2002), também não encontraram diferença na sensibilidade e na resposta máxima à fenilefrina de anéis de ratos expostos a 100

Discussão

pmm de acetato de chumbo (em água de beber) por 28 dias quando comparados ao grupo Controle.

Os resultados supracitados provavelmente devem-se às baixas concentrações de chumbo às quais os animais foram expostos e também ao baixo tempo de exposição (sete dias). Além disso, estes resultados parecem sugerir que o efeito do chumbo sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta é dependente da concentração e do tempo de exposição.

6.2.1 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a modulação endotelial

O resultado apresentado anteriormente mostrou que o tratamento com acetato de chumbo induz uma diminuição da resposta máxima à fenilefrina. Estudo prévio, utilizando o mesmo modelo experimental de tratamento por sete dias com chumbo mostrou um aumento da modulação endotelial em resposta à fenilefrina no grupo exposto ao metal (Fiorim *et al.*, 2011). Este achado, associado à diminuição da reatividade à fenilefrina, sugere que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo aumenta a liberação de um fator vasodilatador dependente do endotélio.

O conhecimento sobre a função endotelial avançou muito nas últimas décadas, desde quando Furchgott e Zawadzki (1980), demonstraram que a célula endotelial modula o tônus vascular. O endotélio sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam o tônus, o calibre do vaso e o fluxo sanguíneo, sendo estas denominadas fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) (Furchgott e Zawadzki, 1980).

Dentre as substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio podemos citar, o NO, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Furchgott e Zawadzki, 1980) e a prostaciclina (Moncada *et al.*, 1977). Dentre os fatores contráteis temos, a angiotensina II (Skeegs, 1954), a endotelina-1 (ET-1) (Yanagisawa *et al.*, 1988), o ânion superóxido (Rubanyi e Vanhoutte, 1986) e os derivados da via do ácido araquidônico, o TXA₂ e as prostaglandinas H₂ e F_{2α} (PGH₂ e PGF_{2α}) (Frölich e Förstermann, 1989). O desequilíbrio da biodisponibilidade destes agentes vasoativos

pode afetar o tônus resultando em prejuízo na homeostasia vascular (Rattmman, 2009).

Tendo em vista que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo promoveu uma diminuição da resposta máxima à fenilefrina e aumentou a modulação endotelial, poder-se-ia supor que este metal influencia a liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio. Neste sentido, o estudo visou investigar algumas vias que possivelmente poderiam esclarecer a ação vascular do chumbo em anéis de aorta de ratos.

6.2.2 Efeito dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

6.2.2.1 Participação do óxido nítrico no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Considerando o resultado do presente estudo, onde encontramos diminuição da reatividade vascular à fenilefrina nos anéis de aorta de ratos tratados com acetato de chumbo, procuramos, por conseguinte, avaliar se a exposição por sete dias a este metal aumentaria os efeitos vasodilatadores do endotélio, através do aumento da biodisponibilidade de NO.

Dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante que modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (Chatterjee *et al.*, 2008). Essa molécula protetora também é considerada uma potente inibidora da agregação plaquetária, adesão e proliferação das células do MLV, o que impede o desenvolvimento da aterosclerose (Forstermann e Munzel, 2006; Chatterjee *et al.*, 2008). Além disso, estudo prévio mostrou importante contribuição do NO em vasos de condutância, como a aorta torácica (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997).

Assim, com o objetivo de avaliar uma possível participação dessa via, foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da sintase do NO. Este fármaco, ao inibir a NOS, impede a síntese de NO e, conseqüentemente, a formação de GMPc na célula muscular.

Discussão

Alterações na via do NO têm sido extensivamente descritas em estudos experimentais de tratamento com chumbo (Carmingnani *et al.*, 2000; Fiorim *et al.*, 2011, 2012; Silveira *et al.*, 2010, 2014; Simões *et al.*, 2015). Neste estudo, o L-NAME potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em ambos os grupos experimentais, mas em maior proporção no grupo Chumbo, conforme demonstrada pela %dAUC. Estes resultados sugerem que a exposição ao metal além de diminuir a reatividade vascular, aumenta a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina por aumentar a biodisponibilidade de NO.

Corroborando com os dados funcionais, os resultados do presente estudo obtidos através da análise dos níveis de NO em aortas torácicas demonstram aumento da liberação de NO (condição basal e estimulada) nos animais tratados com acetato de chumbo quando comparados ao controle.

Estudos prévios mostram que o NO está envolvido nos efeitos vasculares do chumbo, embora os resultados obtidos ainda sejam ambíguos. Fiorim *et al.*, (2011) demonstraram aumento da biodisponibilidade de NO e da fosforilação da eNOS no resíduo de Ser¹¹⁷⁷, em aorta de ratos utilizando o mesmo modelo de exposição controlada ao acetato de chumbo por sete dias. Silveira *et al.*, (2010) também demonstraram aumento da biodisponibilidade de NO após perfusão com 100µM de acetato de chumbo, na presença de L-NAME, no leito arterial caudal. Já Karimi *et al.*, (2002), não evidenciaram diferenças na sensibilidade e na resposta máxima à FE nos anéis de aorta de ratos tratados por 28 dias com 100 ppm de chumbo e incubados com L-NAME, quando comparados ao seu respectivo grupo controle. Por outro lado, Silveira *et al.*, (2014) e Simões *et al.*, (2015) mostraram redução da biodisponibilidade de NO em aorta de ratos tratados com acetato de chumbo por 30 dias. Outros estudos também demonstraram uma diminuição na biodisponibilidade de NO em animais expostos ao chumbo (Vaziri *et al.*, 1997, 1999, 2003).

Apesar da divergência de resultados, esses dados, em sua maior parte, foram obtidos através do tratamento crônico com acetato de chumbo e há uma carência de informações sobre o que ocorreria com NO em uma fase inicial de exposição. Neste sentido, nosso próximo passo foi avaliar por qual via o acetato de chumbo, em baixa concentração e na fase inicial de exposição (sete dias), poderia aumentar a biodisponibilidade de NO e assim, diminuir a resposta à fenilefrina.

6.2.2.2 Efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT₂.

A interação entre os diferentes componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona determina sua atividade e influencia a regulação da pressão arterial, balanço renal de sódio e risco cardiovascular (Lacolly *et al.*, 2009). Dentre os componentes do SRAA, a angiotensina II exerce efeito predominante no tônus vascular, mediado via interação receptores específicos da membrana, o receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT₁) e o receptor de angiotensina do subtipo 2 (AT₂). A maioria das ações fisiológicas da Ang II é mediada via receptor AT₁. Em contraste, sua interação com receptor AT₂ modula negativamente as ações dos receptores AT₁ na maioria das circunstâncias (Shetal e Carey, 2013).

A união entre da angiotensina II com o receptor AT₁ culmina em contração do MLV (Griendling *et al.*, 1996; Touyz e Schiffrin, 2000; Garrido e Griendling, 2009). Por outro lado, a interação da angiotensina II com o receptor AT₂ ativa a via de produção do NO e GMPc que estão envolvidos no processo de relaxamento do MLV (Griendling *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005). A vasodilatação mediada pela ativação do receptor AT₂ tem sido bem demonstrada em artérias de resistência, como a mesentérica, e de condutância, como aorta em vários modelos animais e humanos (Shetal *et al.*, 2013).

Estudos prévios demonstraram que a vasodilatação induzida pelo receptor AT₂ pode ser mediada pela ativação da cascata bradicinina/ NO e GMPc, conforme mostrado anteriormente na Figura 4. A bradicinina, poderia induzir a fosforilação da eNOS nas Ser¹¹⁷⁷ e Ser⁶³³ através da ativação da proteína quinase A (PKA) (Yayama *et al.*, 2006) e na Ser¹¹⁷⁷ através da ativação da proteína serina treonina quinase (Akt) (Shetal e Carey, 2013). Vale ressaltar que o receptor AT₂ pode aumentar a produção de NO de maneira direta, independente da produção bradicinina (Shetal e Carey, 2013).

Já está bem estabelecido na literatura científica que a angiotensina II aumenta a biodisponibilidade de NO em aorta torácica (Pueyo *et al.*, 1998; Yayama *et al.*, 2006). Considerando que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo aumentou a ECA plasmática (Fiorim *et al.*, 2011), reduziu a reatividade vascular à fenilefrina e aumentou a biodisponibilidade de NO, poderíamos supor que a

Discussão

angiotensina II, atuando via receptores AT_2 , poderia estar envolvida no aumento da biodisponibilidade de NO nos animais chumbo. Assim, para investigar se existe maior interação da angiotensina II com os receptores do subtipo AT_2 , os anéis aórticos foram incubados com PD 123319.

Nossos resultados mostram que na condição Controle, o PD 123319 não alterou a resposta contrátil à fenilefrina. No entanto, na presença deste fármaco, houve um aumento da reatividade à fenilefrina no grupo Chumbo, indicando maior interação da angiotensina II com os receptores AT_2 . Dessa forma, a angiotensina II, via receptores AT_2 , poderia estar envolvida no aumento da biodisponibilidade de NO nos animais tratados com acetato de chumbo.

Em contrapartida aos nossos resultados, Nunes *et al.*, (2014), não evidenciaram diferenças na sensibilidade e na resposta máxima à FE nos anéis de aorta de ratos tratados por 30 dias com 100 ppm de chumbo e incubados com PD 123319, quando comparados ao seu respectivo grupo controle.

Em seguida, para confirmar a hipótese de que a angiotensina II, via receptores AT_2 , poderia estar envolvida no aumento da biodisponibilidade de NO nos animais chumbo, foi realizado o protocolo de co-incubação de L-NAME + PD 123319. Após a co-incubação PD 123319 + L-NAME houve aumento da reatividade à fenilefrina nas artérias de ambos os grupos. Ao calcular a %dAUC observou-se que este aumento da reatividade à fenilefrina provocado pelo L-NAME + PD 123319 foi similar nos dois grupos experimentais. Portanto, a maior magnitude de resposta à fenilefrina após incubação somente com L-NAME no grupo chumbo, foi normalizada para níveis controle em presença de L-NAME + PD 123319.

Corroborando com dados funcionais, os resultados do presente estudo obtidos através da análise dos níveis de NO (basal e estimulada), em aortas torácicas, demonstraram que a incubação de L-NAME + PD 123319 normalizou a liberação de NO no grupo chumbo. Em conjunto, os dados sugerem que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo aumentou a biodisponibilidade de NO via receptores AT_2 .

Em adição aos nossos resultados, Yayama e colaboradores (2006) mostraram que a angiotensina II, via receptor AT_2 , induziu a fosforilação da eNOS na Ser⁶³³ e Ser¹¹⁷⁷ em aorta de camundongos submetidos a coartação de aorta. Hiyoshi e colaboradores (2005) também demonstraram que a angiotensina II, via

receptor AT_2 , induziu a fosforilação da eNOS na Ser¹¹⁷⁷ em aorta torácica de camundongos 2K1C.

Segundo Shetal e Carey (2013) os receptores AT_2 desempenham um papel de contra-regulação benéfica sobre a função cardiovascular. Estudos prévios demonstraram aumento da expressão do receptor AT_2 em condições patológicas, como injúria vascular, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Griendling *et al.*, 1996). O mecanismo de ação deste receptor está relacionado à liberação de NO promovendo relaxamento do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005). Contudo, Fiorim *et al.* (2011), não evidenciaram diferença na expressão proteica dos receptores AT_2 entre o grupos Controle e Chumbo, utilizando o mesmo modelo experimental do presente estudo.

6.3 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

A partir dos resultados descritos acima, onde há diminuição da reatividade à FE por um desequilíbrio na função endotelial, foi investigado como o chumbo alterava o relaxamento vascular dependente do endotélio. Para isto, foram realizadas curvas concentração-resposta a acetilcolina. A acetilcolina liga-se ao receptor muscarínico (M_2) levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, o qual ativa a formação e liberação de NO pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO se difunde para o músculo liso vascular, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) promovendo o aumento da concentração intracelular de GMPc. O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, culminando com o relaxamento do vaso por hiperpolarização do músculo liso vascular (Rattmman, 2009). No presente estudo nenhuma alteração estatisticamente significativa no relaxamento à ACh foi observada entre os grupos Controle e Chumbo. Isto sugere que a vasodilatação dependente do endotélio está preservada, ou seja, não alterou a produção de NO estimulada pela acetilcolina.

Resultados semelhantes foram encontrados por Grizzo, *et al.*, (2008), após exposição perinatal de chumbo em aortas de ratos wistar jovens. O relaxamento

Discussão

induzido pela acetilcolina também não foi significativamente diferente quando os anéis de aorta foram incubados *in vitro* com 1ppm de acetato de chumbo por 0.5, 6.0 e 12 horas. Todavia, depois da incubação por 24 horas com chumbo, o relaxamento induzido pela ACh foi menor quando comparado ao Controle (Zhang *et al.*, 2007)

Em contrapartida, Silveira *et al.*, (2010) encontraram prejuízos na resposta vasodilatadora a acetilcolina após a perfusão do leito caudal de ratos, com 100μM de acetato de chumbo. Silveira *et al.*, (2014) e Simões *et al.*, (2015), também observaram prejuízo na resposta vasodilatadora a acetilcolina, nos anéis de aorta de ratos expostos ao chumbo por 30 dias. Essas diferenças entre resultados provavelmente se devem ao baixo tempo de exposição ao metal (sete dias). Além disso, estes resultados sugerem que o efeito do chumbo sobre o relaxamento induzido pela ACh, em anéis de aorta, parece ser dependente da concentração e do tempo de exposição.

Dessa forma, até o momento, é possível dizer que o tratamento por sete dias com acetato de chumbo não alterou a produção de NO estimulada pela acetilcolina, mas diminuiu a reatividade à FE e aumentou a biodisponibilidade de NO. Já está bem descrito na literatura a importância do NO no controle do tônus vascular em artérias de condutância (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997; Félétou e Vanhoutte, 2006). Assim, para avaliar a participação do NO nas respostas vasculares induzidas pela ACh foi realizada uma curva de relaxamento induzido pela ACh, com os anéis de aorta previamente e pré-contraídos com FE e incubados com L-NAME. Nossos resultados mostram que após a incubação com L-NAME houve abolição do relaxamento induzido pela ACh nos grupos estudados. Através deste resultado foi possível demonstrar que o relaxamento induzido pela ACh em aorta de ratos Controle e Chumbo era totalmente dependente da liberação de NO

Considerando os resultados já apresentados, vale ressaltar que dentre os vários mecanismos pelos quais o NO estimula o relaxamento vascular podemos destacar dois, a Na⁺K⁺-ATPase (Gupta *et al.*, 1999) e os canais para K⁺ (Bolotina *et al.*, 1994; Félétou and Vanhoutte, 2006).

Em relação à Na⁺K⁺-ATPase, estudo recente utilizando o mesmo modelo experimental de administração controlada de chumbo por sete dias demonstrou aumento da atividade funcional da Na⁺K⁺-ATPase e a aumento da expressão da subunidade alfa- 1 da Na⁺K⁺-ATPase (Fiorim *et al.*, 2011). Simões *et al.*, (2011)

também mostraram aumento da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ após exposição aguda ao chumbo.

O NO é um fator endotelial que também pode estimular diferentes os canais para K^+ dependendo do vaso e da espécie estudada (Fèlètou e Vanhoutte, 2006; Fèlètou e Vanhoutte, 2009, Nelson e Quayle, 1995; Ko *et al*; 2008; Briones *et al*; 2009; Rodrigues *et al*; 2011). O mecanismo de atuação do NO sobre os canais para K^+ pode ser dependente ou independente da formação de GMPc (Bolotina *et al*; 1994; Fèlètou e Vanhoutte, 2006).

A ativação dos canais para K^+ ocasiona hiperpolarização da membrana das células do MLV que diminui a atividade dos canais para Ca^{+2} voltagem dependentes do tipo L reduzindo o influxo de Ca^{+2} promovendo uma vasodilatação. Assim, os canais para K^+ do MLV desempenham um papel fundamental no controle do potencial de membrana e tônus (Nelson e Quayle, 1995; Ko *et al*; 2008). Vários estudos sobre doenças que cursam com disfunção endotelial e/ou alteração da biodisponibilidade de NO têm relacionado o relaxamento vascular com o papel desempenhado pelos canais para K^+ no controle do tônus (Dimitropoulou *et al*; 2002; Callera *et al*; 2004; Briones *et al*; 2009; Bonaventura *et al*; 2011).

Neste sentido, o próximo passo do estudo foi avaliar o efeito do tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre a atividade funcional dos canais para potássio na resposta de relaxamento à ACh.

Em artérias pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), o relaxamento induzido pela ACh foi reduzido em ambos os grupos experimentais, demonstrando que parte do relaxamento induzido pela ACh pode envolver a ativação de canais para K^+ . Entretanto, essa redução do relaxamento à ACh foi mais evidente nos animais tratados com acetato de chumbo, sugerindo maior participação dos canais para K^+ neste grupo experimental.

Em seguida, para avaliar se o tratamento com acetato de chumbo alterou a participação do NO no relaxamento induzido pela ACh, em artérias pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), utilizou-se L-NAME. Após incubação com L-NAME, o relaxamento induzido pela ACh foi abolido em artérias de ambos os grupos, pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), sugerindo a ativação dos canais para potássio pelo NO.

Sabe-se que uma das vias de vasodilatação do NO pode envolver a ativação de canais para K^+ (Bolontina *et al.* 1994; Félétou e Vanhoutte, 2006, 2009; Félétou, 2009). Considerando maior participação dos canais para K^+ nos animais tratados com chumbo, para estudar o envolvimento dos subtipos de canais para K^+ sobre o tônus basal e a resposta vasodilatadora a ACh os anéis aórticos foram previamente incubados com inibidores dos canais para K^+ .

6.3.1 Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o tônus basal e o relaxamento induzido pela ACh em aorta torácica

Para comprovar a participação dos canais para potássio no relaxamento a ACh, utilizou-se TEA, um inibidor inespecífico dos canais para K^+ . O TEA aumentou o tônus basal em aortas de ambos os grupos experimentais, mas esse efeito foi maior nos animais chumbo. Além disso, esse inibidor reduziu o relaxamento à ACh em aortas dos grupos Controle e Chumbo. Entretanto, esse efeito ocorreu em maior magnitude nos animais chumbo, conforme demonstrado através da área abaixo da curva (%dAUC). Em conjunto, esses resultados sugerem que a participação dos canais para K^+ no controle do tônus e no relaxamento vascular induzido pela ACh é maior nos animais Chumbo.

Corroborando com nossos dados, Fiorim *et al.*, (2011) demonstraram que a incubação com o TEA aumentou a resposta contrátil à fenilefrina nos grupos Controle e Chumbo. Contudo, a magnitude desta resposta foi maior no grupo tratado por sete dias com acetato de chumbo. Nunes e colaboradores (2014) também mostraram que a incubação com o TEA potencializou a resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ambos os grupos, mas estes efeitos foram maiores em preparações de ratos expostos ao chumbo por trinta dias em água de beber. Estes dois resultados sugerem que uma das vias de sinalização que reduzem a reatividade à FE envolve a ativação canais para K^+ nos animais Chumbo.

Estudos prévios sugerem participação dos canais para K^+ no envolvimento das alterações de reatividade vascular em doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial e o diabetes (Kamata *et al.*; 1989; Rossoni *et al.*, 2002; Callera *et al.*; 2004; Bonaventura *et al.*; 2011; Félétou, 2009). Rossoni *et al.* (2002)

demonstraram aumento da biodisponibilidade de NO em ratos tratados com OUA que desenvolveram hipertensão. Além disso, o TEA potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em anéis de ratos tratados com OUA em maior proporção do que no grupo controle. Assim, estes autores sugeriram que o aumento do NO mediado pelo tratamento com OUA poderia estar ativando canais para K^+ .

Por outro lado, Callera *et al.* (2004) e Bonaventura *et al.* (2011) demonstraram que a redução do relaxamento induzido pela ACh em anéis de aorta de ratos estava relacionada com a diminuição do funcionamento dos canais para K^+ em animais com hipertensão arterial induzida pelo modelo dois rins um clipe.

Mesmo considerando expressivos os trabalhos que avaliam a participação dos canais para K^+ no envolvimento das alterações de reatividade vascular em doenças cardiovasculares, há dificuldade de consenso em relação aos resultados dessas pesquisas. Isto se deve principalmente a diversidade de variáveis envolvidas nestes estudos. Assim, para avaliar precisamente os mecanismos de relaxamento dependentes do endotélio, deve-se considerar: espécie utilizada para estudo; modelo experimental, leito vascular e diâmetro do vaso (Callera *et al.*, 2004; Ledoux *et al.*, 2006, Félétou, 2009).

Diferentes canais para K^+ estão envolvidos em desordens cardiovasculares, tais como aterosclerose, hipertensão arterial e acidente vascular cerebral (Nelson e Quayle, 1995; Callera *et al.*, 2004, Ledoux *et al.*, 2006). Considerando que o tratamento por sete dias aumentou a biodisponibilidade de NO e este poderia abrir canais para K^+ , o próximo passo do presente estudo foi investigar a participação dos subtipos de canais para K^+ na regulação do tônus basal e no relaxamento induzido pela ACh.

Já está bem descrito na literatura científica que o NO pode ativar K_v e BK_{Ca} dependendo do leito vascular e da espécie estudada (Bolontina *et al.*, 1994; Paolocci *et al.*, 2001; Félétou e Vanhoutte, 2006) Estudo prévio mostrou que a aorta é fortemente dependente da atividade dos K_v . Neste trabalho os autores estudaram o papel funcional e as propriedades das correntes através dos K_v em toda a membrana celular do miócito isolado de aorta e sugeriram que a corrente através de IK_v (via subunidade $\alpha-K_v 2.1$) é a principal corrente ativada, no repouso e durante a estimulação do MLV da aorta (Tammaro *et al.*, 2004).

Mediante esta informação, para avaliar a participação dos canais K_v no relaxamento induzido pela ACh foi utilizado 4-AP, um inibidor seletivo destes canais.

Discussão

A 4-AP aumentou o tônus basal em aortas de ambos os grupos experimentais, mas esses efeitos foram maiores nos animais chumbo. Além disso, esse inibidor reduziu o relaxamento à ACh em aortas de animais Controle e Chumbo. Entretanto, esses efeitos ocorreram em maior magnitude nos animais chumbo. Em conjunto, os resultados indicam maior contribuição dos K_v no tônus basal e no relaxamento induzido pela ACh nos animais Chumbo.

Mesmo considerando escassos os trabalhos sobre a alteração do funcionamento dos K_v em doenças cardiovasculares, Dias e colaboradores (2011), também mostraram aumento da participação dos K_v em aorta de ratos 30 dias após o infarto do miocárdio.

De forma diferente aos resultados desse trabalho, estudos prévios mostraram diminuição da participação dos K_v em artéria cerebral e renal de animais hipertensos (Wellman *et al.*, 2001; Martens e Gelband, 1996). Os estudos sugerem que atividade dos K_v está diminuída porque o potencial de membrana nessa doença está mais positivo e a atividade dos K_v é dependente de voltagem. A maior positividade do Pm em repouso e um aumento dos níveis de Ca^{+2} intracelular parecem representar um mecanismo de feedback positivo que provoca uma diminuição da atividade dos canais K_v (Wellman *et al.*, 2001; Martens e Gelband, 1996). Contudo, nenhum trabalho demonstrou até o presente momento a participação dos K_v na reatividade vascular após o tratamento por curto período com acetato de chumbo.

Diversos estudos têm mostrado que os K_{Ca} desempenham papel importante na regulação do tônus vascular, em diferentes leitos (Cheong *et al.*, 2002; Eichhorn e Dobrev, 2007; Briones *et al.*, 2009). Assim, para avaliar a participação dos K_{Ca} no tratamento por sete dias com acetato de chumbo, os anéis aórticos foram pré-incubados com bloqueadores específicos dos canais para K_{Ca} de larga (Iberiotoxina-IbTx) e pequena (Apamina) condutância. Apenas a IbTx aumentou o tônus basal em aortas do grupos Controle e Chumbo, mas o efeito foi semelhante em ambos os grupos estudados. Além disso, os dois inibidores reduziram o relaxamento à ACh em aortas de ambos grupos. No entanto, esses efeitos ocorreram em maior magnitude no grupo chumbo, sugerindo uma maior participação dos canais BK_{Ca} e SK_{Ca} no relaxamento induzido pela ACh no grupo Chumbo.

Estudos recentes sugerem que os BK_{Ca} e SK_{Ca} podem desempenhar um papel fundamental na regulação do tônus vascular e da pressão arterial (Sobey, 2001; Ledoux *et al.*, 2005; Briones *et al.*, 2009). Evidências mostram redução da expressão

da subunidade SK_{Ca3}, expressa em células endoteliais, na hipertensão arterial (Félétou 2009).

Os BK_{Ca} desempenham um papel chave na regulação da pressão arterial e há fortes indícios de que sua atividade está aumentada no MLV durante hipertensão crônica (Sobey, 2001; Briones *et al.*, 2009). Briones *et al.* (2009) demonstraram que há um aumento das correntes por BK_{Ca}, mas não por K_v, em coronárias ratos que desenvolveram hipertensão após o tratamento crônico com OUA. Estes autores sugerem que o aumento das correntes de BK_{Ca} poderiam contribuir para preservação da função endotelial em artérias coronárias neste modelo experimental.

Outros trabalhos mostram que o tônus da artéria coronária é fortemente dependente da atividade dos BK_{Ca} (Cogolludo *et al.*, 2007; Briones *et al.*, 2009). Segundo Kim *et al.*, (2003) a atividade dos BK_{Ca} está reduzida em artérias coronárias durante a hipertrofia ventricular esquerda, o qual poderiam contribuir para uma reserva coronariana reduzida observada neste caso.

Atualmente, as EROS são consideradas uma influência modulatória negativa sobre a atividade dos canais para K⁺ em doenças cardiovasculares (Félétou, 2009). Contudo, evidências sugerem que os BK_{Ca} são menos sensíveis aos efeitos deletérios das EROS quando comparados a outros canais para K⁺, assim, eles poderiam desempenhar um papel compensatório na diabetes e na arterosclerose (Liu e Gutterman, 2002; Félétou, 2009).

Além das EROS, outra substância derivada do endotélio está envolvida na modulação da atividade dos BK_{Ca} no MLV. Bolotina *et al.* desde 1994 relataram que o NO é capaz de ativar diretamente os BK_{Ca}. Considerando o aumento da biodisponibilidade de NO nos animais chumbo, este NO poderia estar ativando diretamente os BK_{Ca}, contribuindo para preservação da função endotelial em aorta de ratos.

Como mencionado anteriormente, o efeito do L-NAME sobre o relaxamento à ACh indica que o NO é o mediador do relaxamento em aorta de ratos. Além disso, parte deste relaxamento pode dever-se à ativação de canais para potássio pelo NO. A partir dessas considerações, o nitroprussiato de sódio foi utilizado para avaliar se o tratamento com acetato de chumbo altera o relaxamento do músculo liso vascular induzido pela doação direta de NO.

6.4 EFEITO DO TRATAMENTO POR SETE DIAS COM ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

Para avaliar se o tratamento por sete dias com acetato de chumbo leva prejuízo no relaxamento do músculo liso vascular, foram realizados experimentos com o nitroprussiato de sódio (NPS). Este último age estimulando a GCs que, por diversos mecanismos leva a hiperpolarização das células musculares lisas e por fim ao relaxamento muscular (Gewaltig e Kojda, 2002).

O NPS promoveu resposta vasodilatadora, concentração dependente, semelhante em ambos os grupos experimentais sugerindo que a exposição por sete ao acetato de chumbo não modificou a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular. Vários estudos encontraram resultados semelhantes ao nosso (Silveira *et al.*, 2010; 2014; Fiorim *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2015). Entretanto, Marques e colaboradores (2001) observaram prejuízo na resposta vasodilatadora induzida pelo NPS na exposição de trinta dias ao chumbo, que poderia estar associada a uma diminuição da expressão da guanilato ciclase encontrada nesse estudo.

6.4.1 Participação dos subtipos de canais para potássio no tratamento por sete dias com acetato de chumbo sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aorta torácica.

Embora a exposição ao chumbo não tenha promovido alteração na resposta vasodilatadora induzida pelo NPS, sabe-se que os BK_{Ca} e K_v estão localizados no MLV (Nelson e Quayle, 1995; Félétou e Vanhoutte, 2009). Além disso, Bolontina e colaboradores, desde 1994, demonstraram que o NO pode ativar diretamente os BK_{Ca} . Assim, para avaliar o efeito direto do NO sobre os canais para potássio do músculo liso vascular, os anéis aórticos foram incubados com Iberiotoxina e 4-aminopiridina, inibidores dos BK_{Ca} e K_v respectivamente, e em seguida foi realizada curva de relaxamento ao NPS.

Os inibidores IbTX e 4-AP reduziram o relaxamento ao NPS em aortas dos grupos Controle e Chumbo. Entretanto, esses efeitos ocorreram em maior

magnitude nos animais chumbo. Esses achados sugerem maior participação dos BK_{Ca} e K_v no relaxamento induzido pelo NPS no grupo Chumbo.

Corroborando com nossos achados, Briones *et al.* (2009) demonstraram que há um aumento da participação dos BK_{Ca} no relaxamento ao DEA-NO em coronárias de ratos que desenvolveram hipertensão após o tratamento com OUA. Vale ressaltar que até o presente momento, nenhum trabalho demonstrou a participação destes canais na reatividade vascular após o tratamento com acetato de chumbo.

6.5- SUMARIAÇÃO DOS RESULTADOS

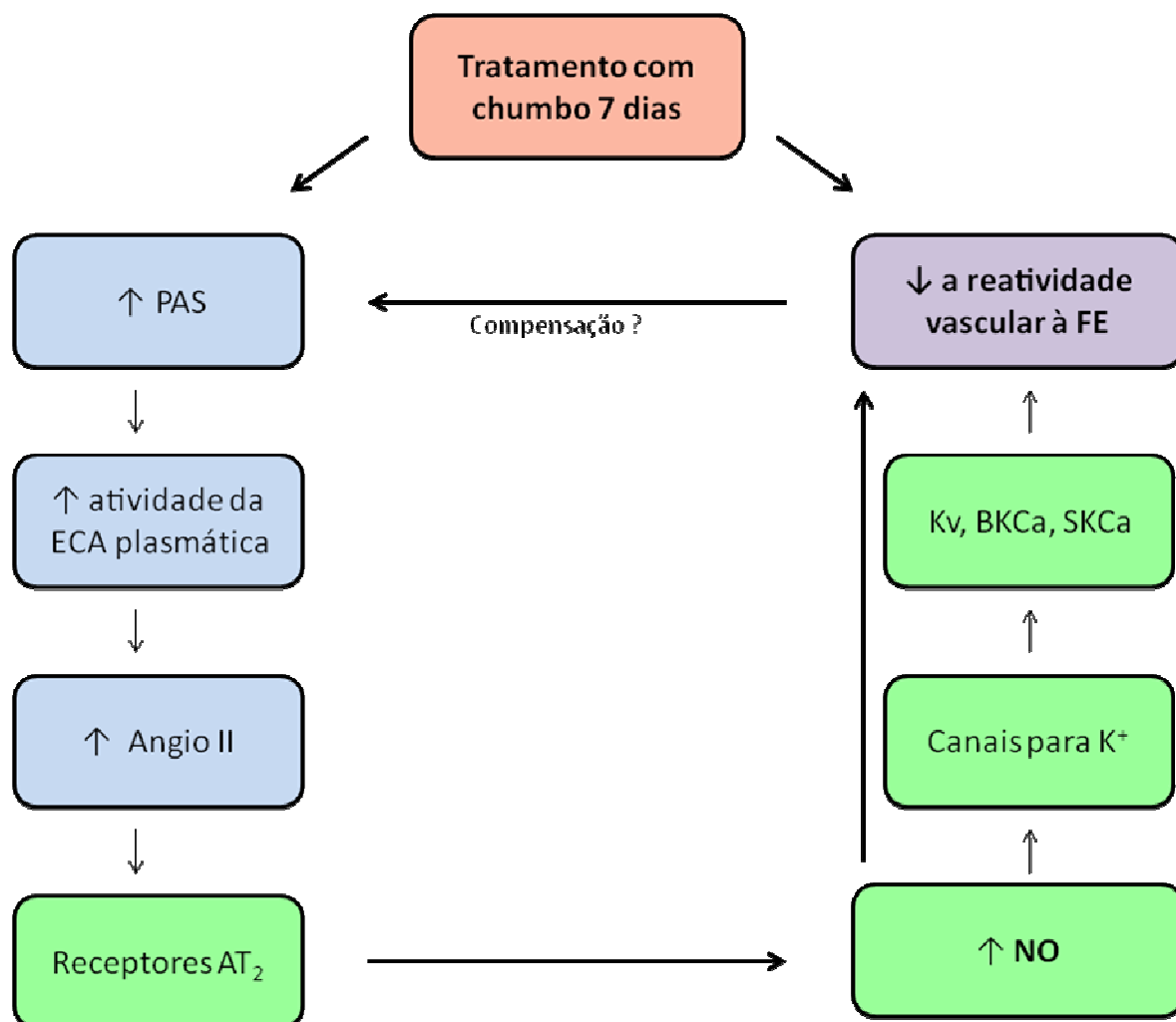


Figura 13: Sumariação esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. O tratamento i.m. com acetato de chumbo aumentou a PAS e a ECA plasmática (Fiorim *et al.*, 2011). Os níveis elevados da ECA plasmática poderia aumentar a Angio II. A interação da angiotensina II com o receptor AT₂ está relacionada com a liberação de NO promovendo vasodilatação (Shetal *et al.*, 2013). O presente estudo mostrou envolvimento dos receptores AT₂ no aumento de biodisponibilidade de NO. Além disso, sabendo que o NO induz a vasodilatação através de diferentes vias, incluindo a ativação de canais para K⁺ (Bolotina *et al.*, 1994; Féletou e Vanhoutte, 2006)., nossos resultados sugerem maior participação dos canais Kv, BK_{Ca} e SK_{Ca} no o controle do tônus vascular.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que o chumbo, mesmo em baixa concentração sanguínea ($\sim 10\mu\text{g/dL}$), foi capaz de alterar o funcionamento da artéria aorta, reduzindo a reatividade à fenilefrina. Esta resposta é endotélio-dependente e decorrente do aumento da biodisponibilidade de NO. O estudo mostrou também envolvimento dos receptores AT_2 neste aumento de biodisponibilidade de NO.

Além disso, sabendo que o NO induz a vasodilatação através de diferentes vias, incluindo a ativação de canais para K^+ , nossos resultados sugerem maior participação dos canais K_v e BK_{Ca} no controle do tônus vascular e no relaxamento induzido pela ACh e ao NPS em aortas de ratos do grupo chumbo.

Em suma, a partir dos resultados apresentados seria possível sugerir que em uma situação de diminuição da reatividade vascular com aumento da biodisponibilidade de NO, causada pelo chumbo, os canais para potássio participassem mais expressivamente do relaxamento vascular contribuindo compensatoriamente ao aumento de PAS. Embora o metal esteja provocando respostas vasculares adaptativas, o aumento de PAS observado sugere que mesmo em baixas concentrações, a exposição ao chumbo deve ser considerada um importante fator de risco cardiovascular e um sério problema para saúde pública.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2005. Toxicological profile for lead.US. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta.

Alonso-Galicia, M., Drummond, H.A., Reddy, K.K., Falck, J.R., Roman, R.J., 1997. Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. *Hypertension*. 29: 320-325.

Angeli, J.K., 2009. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Berridge., M.J., Bootman., M.D., Roderick., H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:517–529.

Blaustein, M.P., Hamlyn, J.M., 2010. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na(+) pump, the Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger and TRPC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1802, 1219–1229.

Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A., 1994. Nitric Oxide directly activates calcium-dependent potassium channel in vascular smooth muscle. *Nature*.368 (6474): 850-853.

Bonaventura, D., de Lima, R.G., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., 2011. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K⁽⁺⁾ channels and sarcoplasmic reticulum Ca⁽²⁺⁾-ATPase. *Life Sci* Aug 3 [Epub ahead of print].

Boscolo, P., Carmingnani, M., 1988. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure, 1988. *Environmental Health Perspectives*. 78: 101-109.

Brasil., 2013. Departamento Nacional de Produção Mineral, Sumário Mineral. Disponível:<<http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSeção=68&IDPagina=316>>.

Brasil., 2008. Lei nº 11.762, de 1º de agosto de 2008. Fixa o limite máximo de chumbo permitido na fabricação de tintas imobiliárias e de uso infantil e escolar, vernizes e materiais similares e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.

Brasil, Ministério da Saúde., 2006. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde.

Brasil., 2009. Ministério de minas e energia. Secretaria de geologia, mineração e transformação mineral-SGM. Desenvolvimento de estudos para elaboração do plano duodecenal (2010 - 2030) de geologia, mineração e transformação mineral.

Brasil, Ministério do Trabalho, 1988. Norma Regulamentadora no 7. Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Portaria GM n.º 3.214, de 08 de junho de 1988.

Briones, A.M., Padilha, A.S., Cogolludo, A.L., Alonso, M.J., Vassallo, D.V., Pérez-Vizcaino, F., Salaices, M., 2009. Activation of BKCa channels by nitric oxide prevents coronary artery endothelial dysfunction in ouabain-induced hypertensive rats. *J Hypertens.* 27:83–91.

Carmingnani, M., Boscolo P., Poma, A., Volpe, A.R., 1999. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacology.* 44 (1-2):105-110.

Carmingnani, M., Volpe, A.R., Boscolo, P., Qiao, N., Gioacchino, M.D., Grilli, A., Felaco, M. 2000. Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sciences.* 68: 401-451.

Referências Bibliográficas

- Callera, G.E., Yogi, A., Tostes, R.C., Rossoni, L.V., Bendhack, L.M., 2004. Ca^{2+} activated K^{+} channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 309:1036–1042.
- Cannon III., R.O. 1998. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*. 44(8): 1809-1819.
- Capitani, E.M., Paoliello M.M.B., Costa de Almeida GR. 2009. Fontes de exposição humana de chumbo no Brasil. *Medicina*.42(3):301-308.
- Chatterjee, A., Catravas, J.D., 2008. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology*. 49: 134-140.
- Cheong, A., Quinn, K., Dedman, A. M., Beech, D. J., 2002. Activation thresholds of K_V , BK and ClCa channels in smooth muscle cells in pial precapillary arterioles. *Journal of Vascular Research* 39: 122–130.
- Cogolludo, A., Frazziano, G., Briones, A. M., Cobenõ, L., Moreno, L., Lodi, F., *et al.* 2007. The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H_2O_2 . Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res*. 73:424–431.
- Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., *et al.* 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulador of heart function. *Nature*. 417: 822-828.
- Den Hond, E., Nawrot, T., Staessen, J. A., 2002. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III National Health and Nutritional Examination Survey. *J. Hum. Hypertens*. 16: 563-568.
- Dias, Fernanda Moura Vargas. Avaliação da participação da $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ - ATPase e dos canais para K^{+} na reatividade de anéis isolados de aorta de ratos após infarto agudo do miocárdio. 2011. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Programa de

Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

Dias, F. M. V., Ribeiro Júnior, R.F., Fernandes, A. A., Fiorim, J., Travaglia, T.C. F., Vassallo, D.D., Stefanon, I., 2014. Na^+K^+ -ATPase Activity and K^+ Channels Differently Contribute to Vascular Relaxation in Male and Female Rats. *PLoS ONE*.9(9).

Dick, G.M., Tune, J. D., 2010. Role of potassium channels in coronary vasodilation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 235 (1):10-22.

Dimitropoulou C., Han G., Miller A.W., Molero M, Fuchs L.C., White R.E., Carrier G.O., 2002. Potassium (BK_{Ca}) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats. *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology* 282 (3): 908-17.

Eichhorn, B., Dobrev, D., 2007. Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: Functional role and therapeutic potential. *Arch Pharmacol*. 376:145–155.

Ganitkevich, V.Y., Isenberg, G., 1991. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*. 435: 187–205.

Griendling K.K., Lassegue B., Alexander R.W., 1996. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review Pharmacology Toxicology*.36: 281-306.

Gupta, S., McArthur, C., Grady, C., Ruderman, N. B., 1994. Stimulation of vascular Na^+K^+ -ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol*. 266(35): H2146-H251.

Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G., 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. 76, 967–1003.

Referências Bibliográficas

Félétou, M., Vanhoutte, P. M., 2006. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1215–1225.

Félétou, M., Vanhoutte, P., 2009. EDHF: an uptape. *Clinical Science.* 117, 139–155.

Fioresi, M., Simões, M.R., Furieri, L.B., Broseghini-Filho, G.B., Vescovi, M.V.A., et al., 2014. Chronic Lead Exposure Increases Blood Pressure and Myocardial Contractility in Rats. *PLoS ONE.* 9(5).

Fiorim, J., Ribeiro Júnior, R.F., Azevedo, B.F., Simões, M.R., Padilha, AS, Stefanon, I., et al., 2012. Activation of K⁺ channels and Na⁺/K⁺ ATPase prevents aortic endothelial dysfunction in 7-day lead-treated rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 262 (2012): 22–31.

Fiorim, J., Ribeiro Júnior, R.F., Silveira, EA, Padilha, AS, Vescovi, M.V.A., et al., 2011. Low-Level Lead Exposure Increases Systolic Arterial Pressure and Endothelium-Derived Vasodilator Factors in Rat Aortas. *PLoS ONE.* 6(2).

Forstermann, U., Munzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. From Marvel to menace. *Circulation.* 113: 1708-1714.

Fozard J.R., Manley P.W., 2001. Potassium Channel openers. *Prog. Respir Res. Basel. Karger.* Vol 31. 77-80.

Frolish J.C., Forstermann U., 1989. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Advanced Prostaglandin. Tromboxane and leukotriene research.* 19:211-215.

Furchgott R.F., Zawadzki J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288: 373-6.

Ganitkevich, V.Y., Isenberg, G., 1991. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J Physiol.* 435, 187–205.

Garrido, A.M., Griendling, K.K., 2009. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 302: 148-158.

Gewaltig, M.T., Kojda, G., 2002. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*. 55: 250–260.

Goyer R.A., 1991. Toxic effects of metals – Lead, pp. 639-646. In Mary O. Amdur, J.D.; Curtis D.K. *Casareh and Doull's toxicology – the basic science of poisons* 1991; Editora Pergamon Press, USA.

Grizzo L.T., Cordelline S., 2008. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences*. (1): 207-214.

Griendling, K. K., Lasségue, B., Alexander, R. W., 1996. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. 36: 281-306.

Haddy, F.J., Vanhoutte, P.M., Feletou, M. 2006. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290 (3): 546-52.

Healey N., 2009. Lead Toxicity, Vulberable subpopulations and emergency preparedness. *Radiation Protection Dosimetry*.134 (3-4): 143-151.

Heydari A., Norouzzadeh A., Khoshbaten A., Asgari A., Ghasemi A., Nafafi S., Badalzadeh R., 2006. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide methabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicology Letters*. 166: 88-94.

Hiyoshi, H., Yayama, K., Takano, M., Okamoto, H., 2005. Angiotensin Type 2 Receptor-Mediated Phosphorylation of eNOS in the Aortas of Mice With 2-Kidney, 1-Clip Hypertension. 2005. *Hypertension*. 45:967-973.

Referências Bibliográficas

[IUPAC] Commission on Atomic Weights and isotopic Abundances report for the International Union of Pure and Applied Chemistry in Atomic Weights of the Elements. 2003. *Pure and Applied Chemistry*. 75: 1107-1122.

Jackson W.F., 2000. Ion Channels and vascular tone. *Hipertension*. 35(1): 173-78.

Jackson W.F., 2005. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. *Microcirculation* 12 (1): 113-27.

Kamata, K., Miyata, N., Kasuya, Y., 1989. Functional changes in potassium channels in aortas from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol* 166 (2): 319-23.

Karimi G., Khoshbaten A., Abdollahi M., Sharifzadeh M., Namiranian K., Dehpour R.A., 2002. Effectes of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacological Research*. 46 (1): 31-37.

Khalil-Manesh, F., Gonixk, H.C., Weiler, E.W., Prins, B., Weber, M.A., Purdy, R.E. 1993. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *American Journal of Hypertension*. 6:723-729.

Kim, N.R., Chung J.Y., Kim E.Y., Han J., 2003. Changes in the Ca²⁺-activated K⁺ channels of the coronary artery during left ventricular hypertrophy. *Circulation Research* 93: 541–547.

Kosnett M.J., Wedeen R.P., Rothenberg S.J., Hipkins K.L., Materna B.L., Schwartz B.S., Hu H., Woolf A., 2007. Recommendations for a medical management of adult lead exposure. *Envionmental Health Perspectives*. 115 (3) 463-471.

Lacolly P., Safar M.E., Regnault V., Frohlich E.D., 2009. Angiotensin II, mechanotransdução, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension. *American Journal Physiology Heart Circulatory Phisiology*. 297: 1567-1575.

Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*. 28: 83-97.

Ledoux, J., Werner, M.E., Brayden, J.E., Nelson, M.T., 2006. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*. 21: 69–76.

Lincoln, T., Dey, N., Sellak, H. 2001. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal Applied Physiology*. 91: 2001.

Liu, Y., Gutterman D.D., 2002. The coronary circulation in diabetes: influence of reactive oxygen species on K⁺ channel-mediated vasodilation. *Vascul Pharmacol* 38: 43–49.

Lustberg, M., Silbergeld, E., 2002. Blood lead levels and mortality. *Archives Internal Medicine*. 162: 2443-2449.

Marques, M., Millás I., Jiménez A., García-Colis E., Rodrigues-Feo J.A., Velasco S., Barrientos A., Casado S., López-Farré A. 2001. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 12: 2594-2600.

Martens, J.R., Gelband, C.H., Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels in genetic and nongenetic mechanisms. 1996. *Circulation Research*. 79: 295–301.

Martín, M.C., Balfagón, G., Minoves, N., Blanco-Rivero, J., Ferrer, M., 2005. Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide*. 12(3): 163 - 176.

Matos, R.Q., Ferreira, O.M., 2007. Recuperação de chumbo de baterias automotivas, análise de risco dos resíduos resultantes. Universidade católica de goiás – departamento de engenharia – engenharia ambiental.

Referências Bibliográficas

Mayer, M.G., Wilson, D.N., 1998. Health and safety- the downward trend in lead levels. *Journal of Power Sources*.73: 17-22.

Menke A., Muntner P., Batuman V., Silbergeld E.K., Guallar E., 2006. Blood lead below 0,48 μ mol/L (10 μ g/dL) and mortality among US adults. *Circulation*. 114: 1388-1394.

Moraes, G.A., 2014. Normas Regulamentadoras Comentadas. 11 edição. Revisada, ampliada, ilustrada e atualizada. Rio de Janeiro. 23,1045.

Moncada S., Herman A.G., Higgs E.A., Vane J.R., 1977. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*. 11: 323-44.

Moreira, F.R., Moreira, J.C., 2004. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*. 9: 167-181.

Navas-Ancien A., Guallar E., Silbergeld E.K, Rothenberg S.J., 2007. Lead exposure in cardiovascular disease –A systematic review. *Environmental Health Perspectives*.115: 472-482.

Nelson, M.T., Quayle, J.M. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American Physiological Society* 269 (37): C799-C822).

Nunes, Dieli Oliveira. Efeitos do tratamento intramuscular por quinze dias com óleo de linhaça sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

Nunes, Karolini Zuqui. A Exposição crônica ao chumbo diminui a reatividade vascular em aorta de ratos: papel do peróxido de hidrogênio. 2014. 114 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

Kamata, K., Miyata, N., Kasuya, Y. 1989. Functional changes in potassium channels in aortas from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol.* 166 (2): 319-23.

Ko, E. A., Han, J., Jung, I. D., Park, W. S., 2008. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research.* 44 (2): 65–81.

Kolluru, G.K., Siamwala, J.H., Chatterjee. 2010. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie.* 30:1-13.

Kosnett, M.J., Wedeen, R.P., Rothenberg, S.J., Hipkins, K.L., Materna, B.L., Schwartz, B.S., Hu, H., Woolf, A. 2007. Recommendations for a medical management of adult lead exposure. *Environmental Health Perspectives.* 115 (3) 463-471.

Paoliello, M.M.B., Chasin, A.A.M., 2001. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental.* v.3.

Patrick, L. 2006. Lead Toxicity. Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review.* 11 (2) 114-127.

Pueyo M.E., Arnal J.F., Rami J., Michel J.B., 1998. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *The American Journal of Physiology.* 247:214-220.

Rabinowitz, M.B., Wetherill, G.W., Kopple, J.D., 1976. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *The Journal of Clinical Investigation* 58(2): 260-270.

Rattmann, Y.D, Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009.145f. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Referências Bibliográficas

- Rodrigues G.J., Cicillini S.A., Silva R.S., Bendhack L.M., 2011. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. *Nitric Oxide* Jun 16 [Epub ahead of print].
- Rossoni, L.V., Salaices, M., Marín, J., Vassallo, D. V., Alonso, M. J., 2002. Alterations in phenylephrine induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain- induced hypertension. *Br J Pharmacol*. 135(3): 771-81.
- Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M., 1986. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 250 (19): 815-821.
- Saryan, L.A., Zenz, C., 1994. Lead and its compounds. Occupational medicine. Editora Mosby-Year Book, Inc., EUA.
- Sepulveda, M.A.C., 2009. Participação do receptor AT₂ da angiotensina II no relaxamento vascular promovido pelo hormônio tireoidiano. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.
- Sharifi A.M., Darabi R., Akbarloo N., Larijani B., Khoshbaten A., 2004. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. *Toxicology Letters*. 153: 233-238.
- Shetal, H. P., Carey, R. M., 2013. AT₂ receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch*. 465(1): 99–110.
- Silveira, E.A., Lizardo, J.H.F., Souza, L.P., Stefanon, I., Vassallo, D.V., 2010. Acute lead-induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails in endothelium dependent. *Brazilian Journal Medical Biological Research*. 43(5): 492-499.

Silveira, E.A., Siman, F.D., de Oliveira Faria, T., Vescovi, M.V., Furieri, L.B., et al., 2014. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic Biol Med.* 67: 366-76.

Simões, M.R., Aguado, A., Fiorim J., Silveira, E.A., Azevedo, B.F., Toscano C.M., Zhenyukh, O., Briones, A.M., Alonso, M.J., Vassallo, D.V., Salaices, M., 2015. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 14, 283(2):127-138.

Simões, Maylla Ronacher. Exposição crônica ao chumbo aumenta a reatividade vascular através de mecanismos dependentes do estresse oxidativo e da ciclooxigenase-2: ativação da via das MAPKs.. 2015. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

Simões, M.R., Ribeiro-Júnior, R.F., Vescovi, V.A., de Jesus, H.C., Padilha, A. S Stefanon, I., Vassallo, D.V., Salaices, M., Fiorese, M., 2011. Acute Lead Exposure Increases Arterial Pressure: Role of the Renin-Angiotensin System. *Plos One.* v 6.Issue 4.e 18730.

Skeegs L.T., 1954. The existence of two forms of hyperensin.*The Journal of Experimental. Medicine.* 100: 363.

Stephan, M.C., 2007. Avaliação dos níveis de contaminação por metais pesados em amostras de sedimentos da região de Santos e Cubatão.66 f. Tese de Mestrado em Saúde Coletiva. Universidade Católica de Santos.

Sobey C.G., 2001. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (1): 28-38.

Somlyo, A.P., Somlyo, A. V., 2000. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 522 Pt 2, 177–185.

Referências Bibliográficas

Souza AM, Tavares CFF. Chumbo e anemia. *Medicina*. 2009; 42(3): 327-30.

Steckelings U.M., Kaschima E., Unger T., 2005. The AT₂ receptor – A matter of love and hate. *Peptides*. 26: 1401-1409.

Sun, C.W., Alonso-Galicia, M., Taheri, M.R., Falck, J.R., Harder, D.R., et al. 1998. Nitric oxide-20-Hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K⁺ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ Res*. 83: 1069-1079.

Tammaro, P., Smith, A. L., Hutchings, S. R., Smirnov, S.V., 2004. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. 143: 303–317.

Touzy, R.M., Schiffrin, E.L. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*. 52: 639-672.

Tsalev, D.L, Zaprianov, Z.K., 1985. Lead. In Atomic absorption spectrometry in occupational and environment health practice. *CRC Press*. 137-150.

Tsao, D.A., Yu, H.S., Cheng, J.T., Ho, C.K., Chang, H.R., 2000. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicological and Applied Pharmacological*. 164(2):127-33.

Triggle, C.R., Hollenberg, M., Anderson, T.J., Ding, H., Jiang, Y., Ceroni, L., Wiehler, W.B., Ella, S.M.N., Ellis, A., Andrews, K., McGuire, J.J., Pannirselvam M. 2003. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*. 39(6): 249-267.

Urakami-Harasawa, L., Shimokawa, H., Nakashima, M., Egashira, K., Takeshita, A., 1997. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin. Invest*. 100: 2793-2799.

Vaziri N.D., Ding Y., Ni Z., Gonick H., 1997. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension. *Kidney International*. 52: 1042-1046.

Vaziri N.D., Liang K., Ding Y., 1999. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney International*. 56: 1492-1498.

Vaziri N.D., Lin C.Y., Farmand F., Sindhu R.K., 2003. Superóxido dismutase, catalase, glutathione, peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney International*. 63: 186-194.

Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z., 2001. Compensatory Up-regulation of nitric oxide syntase isoform in lead-induced hypertension; Reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* .298: 679-685.

Vupputuri S., He J., Muntner P., Bazzano L.A., Whelton P.K, Batuman V., 2003. Blood Lead Level Is Associated With Elevated Blood Pressure in Blacks. *Hypertension*. 41: 463-468.

Wellman, G.C., Cartin, L., Eckman, D.M., Stevenson, A.S., Saundry, C.M., Lederer, W.J., Nelson, M.T., 2001. Membrane depolarization, elevated Ca^{2+} entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am J Physiol*. 281: H2559–2567.

WHO. 2013. Cardiovascular diseases (CVDs). World health organization. Disponível em: www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/en/ Acesso em 12 de dezembro de 2014.

World Health Organization (WHO). IPCS. *Environmental Health criteria-165-Inorganic Lead*. Geneva, 1995. 300p. Publish under the joint sponsorship the United Nations. Environmental Program, the International Labour Organization, and the world health organization.

Referências Bibliográficas

Wrzosek, A. Endothelium as target for large-conductance calcium-activated potassium channel openers. 2009. *Acta Biochim Pol.* 56(3):393-404.

Yayama k., Hiyoshi, H., Imazu D., Okamoto, H., Okamoto., 2006. Angiotensin II Stimulates Endothelial NO Synthase Phosphorylation in Thoracic Aorta of Mice With Abdominal Aortic Banding Via Type 2 Receptor. *Hypertension*.48:958-964.

Yanagesawa M., Kurihara S., Kimura S., Tomobe Y., 1988. Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*.322: 411-415.

Yazbeck C., Thiebaugeorges O., Moureau T., Goua V., Debotte G., Sahuquillo J., Forhan A., Foliguet B., Magnin G., Slama R., Charles M.A., Huel G., 2009. Maternal blood lead levels and the risk of pregnancy-induced hypertension: The EDEN cohort study. *Environmental Health Perspectives*.117: 1527-1530.

Zhang L.F., Peng S.Q., Sheng M., Li B.L, Gang H., Sheng D.Y., 2007. Direct effects of lead (Pb^{+2}) on the relaxation of in vitro cultured rat aorta to acetylcholine. *Toxicology Letters*.170: 104-110.

Zhang L.F., Peng S.Q., Wang S., 2009. Decreased aortic contractile reaction to 5-hydroxytryptamine in rats with long-term hypertension induced by lead (Pb^{+2}) exposure. *Toxicology Letters*. 186: 78-83.

ANEXO I – Artigo publicado referente a Tese

Author's personal copy

Toxicology and Applied Pharmacology 262 (2012) 22–31



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

Activation of K^+ channels and Na^+/K^+ ATPase prevents aortic endothelial dysfunction in 7-day lead-treated ratsJonaina Fiorim^{a,*}, Rogério Faustino Ribeiro Júnior^a, Bruna Fernandes Azevedo^a, Maylla Ronacher Simões^a, Alessandra Simão Padilha^a, Ivanita Stefanon^a, Maria Jesus Alonso^c, Mercedes Salas^b, Dalton Valentim Vassallo^a^a Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil^b Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Spain^c Departamento de Ciencias de la Salud III, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2012

Revised 10 April 2012

Accepted 12 April 2012

Available online 23 April 2012

Keywords:

Lead

Nitric oxide

 Na^+/K^+ -ATPase activity

Potassium channels

ABSTRACT

Seven day exposure to a low concentration of lead acetate increases nitric oxide bioavailability suggesting a putative role of K^+ channels affecting vascular reactivity. This could be an adaptive mechanism at the initial stages of toxicity from lead exposure due to oxidative stress. We evaluated whether lead alters the participation of K^+ channels and Na^+/K^+ -ATPase (NKA) on vascular function. Wistar rats were treated with lead (1st dose 4 µg/100 g, subsequent doses 0.05 µg/100 g, im, 7 days) or vehicle. Lead treatment reduced the contractile response of aortic rings to phenylephrine (PHE) without changing the vasodilator response to acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP). Furthermore, this treatment increased basal O_2^- production, and apocynin (0.3 µM), superoxide dismutase (150 U/mL) and catalase (1000 U/mL) reduced the response to PHE only in the treated group. Lead also increased aortic functional NKA activity evaluated by K^+ -induced relaxation curves. Ouabain (100 µM) plus L-NAME (100 µM), aminoguanidine (50 µM) or tetraethylammonium (TEA, 2 mM) reduced the K^+ -induced relaxation only in lead-treated rats. When aortic rings were precontracted with KCl (60 mM/L) or preincubated with TEA (2 mM), 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM), ibetoxin (IbTX, 30 nM), apamin (0.5 µM) or charybdotoxin (0.1 µM), the ACh-induced relaxation was more reduced in the lead-treated rats. Additionally, 4-AP and IbTX reduced the relaxation elicited by SNP more in the lead-treated rats. Results suggest that lead treatment promoted NKA and K^+ channels activation and these effects might contribute to the preservation of aortic endothelial function against oxidative stress.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Lead has historically been used in a wide variety of human activities, which has significantly increased its emission into the atmosphere (Patrick, 2006). Therefore, all humans have an associated lead burden due to exposure to exogenous sources (Levin and Goldberg, 2000). The adverse effects of lead on the heart and vessels have been previously demonstrated (Fiorim et al., 2011; Silveira et al., 2010; Vassallo et al., 2008). Numerous studies have revealed that chronic or acute lead exposure increases oxidative stress (Silveira et al., 2010; Vaziri et al., 1999a),

lipid peroxidation (Ding et al., 1998; Vaziri et al., 1999b), and affects antioxidant reserves (Farmand et al., 2005; Vaziri et al., 2003).

Vascular endothelium is highly sensitive to oxidative stress, and this stress is the main cause of the endothelial dysfunction observed in cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension and stroke (Chatterje and Catravas, 2008; Forstermann and Munzel, 2006). It is well established that lead exposure induces endothelial dysfunction, and therefore, it could be considered an important cardiovascular risk factor and a serious problem for public health (Patrick, 2006; Poreba et al., 2011; Silveira et al., 2010; Vaziri et al., 1999a).

Recently, we demonstrated that a 7-day treatment with a low concentration of lead acetate increases NO bioavailability and Na^+/K^+ -ATPase activity in the rat aorta (Fiorim et al., 2011). NO, a short lived gas, is an important protective molecule in the vasculature, especially in conductance arteries. NO is synthesized in the endothelium and diffuses from it to the vascular lumen being a potent inhibitor of platelet aggregation, adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells, and it prevents the development of atherosclerosis (Chatterje and Catravas, 2008; Forstermann and Munzel, 2006; Poreba et al., 2011; Triggle et al., 2003). Thus, in response to various neurohumoral

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, CCS/UFES, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, 29040-091, Vitória, ES, Brazil. Fax: +55 27 2122 7330.

E-mail addresses: nanafiorim@hotmail.com (J. Fiorim), faustino43@oi.com.br (R.F. Ribeiro Júnior), brunafmendesazevedo@gmail.com (B.F. Azevedo), yllam@hotm.com (M.R. Simões), al_spadilha@yahoo.com.br (A.S. Padilha), ivanita@pq.cnpq.br (I. Stefanon), maria.jesus.alonso@urj.es (M.J. Alonso), mercedes.salas@uam.es (M. Salas), daltonv2@terra.com.br (D.V. Vassallo).

stimuli, endothelial cells release NO, which produces vasodilation of the vascular smooth muscle cells. In addition, NO could also stimulate Na^+/K^+ -ATPase activity (Gupta et al., 1994) and open K^+ channels (Bolotina et al., 1994; Félétou and Vanhoutte, 2006), which contribute to maintain adequate vascular function.

The Na^+/K^+ -ATPase is responsible for maintaining the cellular membrane potential and contributes to the regulation of vascular tone and blood pressure. Thus, alterations in the Na^+/K^+ -ATPase could be related to cardiovascular disease (Marín and Redondo, 1999). In a previous report, it has been shown that chronic lead exposure causes cardiovascular disease by inhibiting Na^+/K^+ -ATPase (Weiler et al., 1990). However, our recent studies have shown that acute (Simões et al., 2011) or 7-day lead exposure increases Na^+/K^+ -ATPase activity and the expression of the α -1 subunits of Na^+/K^+ -ATPase (Florim et al., 2011).

K^+ channel activation has been identified as an important component in vascular tone regulation (Ko et al., 2008; Nelson and Quayle, 1995). Activation of K^+ channels in vascular smooth muscle leads to hyperpolarization, decreases the activity of voltage-gated L-type Ca^{2+} channels, reduces $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and induces vasodilation (Ledoux et al., 2006). Many subtypes of K^+ channels have been identified in endothelial and smooth muscle cells (Félétou, 2009; Félétou and Vanhoutte, 2009; Standen and Quayle, 1998). In vascular smooth muscle cells, K_v channels are activated by membrane depolarization in the physiological range (Nelson and Quayle, 1995), while the large conductance K_{Ca} channels (BK_{Ca}) are activated mainly by increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Eidholm and Dobrev, 2007; Ledoux et al., 2006). The involvement of K^+ channels in cardiovascular disorders depends on the vascular tissue or species studied (Ko et al., 2008). Thus, BK_{Ca} channels play a key role in regulating vascular tone in resistance arteries (Briones et al., 2009; Eichhorn and Dobrev, 2007), while aortic tone is strongly dependent on the activity of K_v channels (Tammaro et al., 2004).

The regulatory function of the endothelium is altered by cardiovascular risk factors or disorders, such as heavy metal exposure (Silveira et al., 2010; Triggler et al., 2003; Wiggers et al., 2008). We aimed to evaluate whether K^+ channels and Na^+/K^+ -ATPase activation promoted by 7-day treatment with lead could be a compensatory mechanism against increased free radical production in the initial stages of lead exposure. Thus, we analyzed the effects of this treatment on the following: 1) reactive oxygen species (ROS) production and its participation in vascular responses to vasoconstrictors; 2) involvement of the NO pathway in Na^+/K^+ -ATPase functional activity; and 3) participation of K^+ channels in the relaxation induced by acetylcholine and sodium nitroprusside. Our findings provide evidence that the activation of K^+ channels and Na^+/K^+ -ATPase prevents the aortic endothelial dysfunction induced by increased free radicals in lead-treated rats.

Materials and methods

Animals and treatment Male Wistar rats (250–300 g) were used for these studies. The care and use of laboratory animals were in accordance with the NIH guidelines, and all experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (CEUA-UFES 052/2011). All rats had free access to water and were fed with rat chow *ad libitum*. The rats were divided into two groups: control (vehicle-saline, intramuscular) or treated with lead acetate for 7 days (1st dose: 4 $\mu\text{g}/100$ g, subsequent doses: 0.05 $\mu\text{g}/100$ g, intramuscular, to cover daily loss). No differences in body weight between the two groups were observed before (untreated: 260 ± 0.89 g, $n=38$; lead-treated: 258 ± 0.99 g, $n=40$; $P>0.05$) or after treatment (untreated: 308 ± 2.45 g, $n=38$; lead-treated: 312 ± 2.63 g, $n=40$; $P>0.05$). At the end of the treatment, the rats were anesthetized with pentobarbital (35 mg/kg, intraperitoneal) and killed by

exsanguination. The thoracic aortas were carefully dissected out, and the fat and connective tissue were removed. For the vascular reactivity experiments, the aortas were divided into cylindrical segments 4 mm in length.

Vascular reactivity measurements. The aortic segments were mounted between two parallel wires in organ baths containing Krebs–Henseleit solution (KHS, in mM: 124 NaCl, 4.6 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1.2 MgSO_4 , 1.2 KH_2PO_4 , 0.01 EDTA, 23 NaHCO_3) at 37 °C and gassed with 95% O_2 –5% CO_2 (pH 7.4). The arterial segments were stretched to an optimal resting tension of 1 g. Isometric tension was recorded using a force transducer (TSD125C, CA, USA) connected to an acquisition system (MP100A, BIOPAC System, Inc., Santa Barbara, USA). After a 45 min equilibration period, all aortic rings were initially exposed twice to 75 mM KCl. The first exposure checks their functional integrity, and the second exposure assesses the maximal tension. Next, endothelial integrity was tested with acetylcholine (ACh, 10 μM) in segments previously contracted with phenylephrine (1 μM). A relaxation equal to or greater than 90% was considered demonstrative of the functional integrity of the endothelium. After a 45-min washout period, concentration–response curves to phenylephrine were determined. Single curves were performed in each segment. The effects of apocynin (0.3 μM , an inhibitor of NADPH oxidase), superoxide dismutase (SOD) (150 U/mL) and catalase (1000 U/mL) were investigated by adding them to the bath 30 min before performing the phenylephrine concentration–response curves.

In another set of experiments, after the 45-min equilibration period, aortic rings from untreated and lead-treated rats were pre-contracted with phenylephrine (1 μM) or 60 mmol/L KCl, and the concentration–response curves to ACh (0.1 nM–300 μM) were determined. The role of NO in the relaxation induced by ACh was analyzed by incubating the vessels with N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM , nonspecific NOS inhibitor) for 30 min before phenylephrine or KCl administration. The contribution of K^+ channels to ACh-induced relaxation was assessed in aortas previously incubated for 30 min with the K^+ channel blockers tetraethylammonium (TEA, 2 mM, nonselective blocker of K^+ channels), 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM, K_v blocker), ibertoxin (IbTX, 30 nM, selective BK_{Ca} blocker), apamin (0.5 μM , selective blocker of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels – SK_{Ca}) and charybdotoxin (ChTX, 0.1 μM , blocker of K_{Ca} and K_v).

In some experiments, the concentration–response curves to sodium nitroprusside (SNP, 0.01 nM–0.3 μM) were performed in segments contracted with phenylephrine (1 μM). The role of the K_v and BK_{Ca} channels in the SNP-induced relaxation was analyzed by incubating the vessels with 4-AP and IbTX, respectively, for 30 min before phenylephrine administration. The influence of the endothelium on the response to SNP in untreated and lead-treated rats was investigated after its mechanical removal, which was performed by rubbing the lumen with a needle. The absence of endothelium was confirmed by the inability of 10 μM acetylcholine (ACh) to produce relaxation.

The functional activity of the Na^+/K^+ -ATPase was measured in segments from untreated and lead-treated rats using K^+ -induced relaxation, as described by Weeb and Bohr (1978) and modified by Rossoni et al. (2002). After a 30-min equilibration period in normal Krebs, the preparations were incubated for 30 min in K^+ -free Krebs. The vessels were subsequently pre-contracted with phenylephrine, and once a plateau was attained, the KCl concentration was increased stepwise (1, 2, 5 and 10 mM) with each step lasting for 2.5 min. After a washout period, the preparations were incubated with 100 μM ouabain (OUB) for 30 min to inhibit sodium pump activity, and the K^+ -induced relaxation curve was repeated. To study the involvement of NO, inducible NO synthase (iNOS) and K^+ channels in OUB-sensitive Na^+/K^+ -ATPase functional activity, the rings were incubated with L-NAME (100 μM), aminoguanidine (50 μM) and TEA (2 mM), respectively. Moreover, the influence of the endothelium was investigated, repeating the same protocols after its mechanical removal.

In situ detection of vascular O_2^- production. The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate O_2^- production in situ, as previously described by Wiggers et al. (2008). Dihydroethidium freely permeates cells and is oxidized in the presence of O_2^- to ethidium bromide, which is trapped by intercalation with DNA. Ethidium bromide is excited at 546 nm and has an emission spectrum of 610 nm. Frozen tissue segments were cut into 10- μ m-thick sections and placed on a glass slide. Serial sections were equilibrated under identical conditions for 30 min at 37 °C in Krebs-HEPES buffer (in mM: 130 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl₂, 0.24 MgCl₂, 8.3 HEPES, and 11 glucose, pH = 7.4). Fresh buffer containing DHE (2 μ M) was applied topically to each tissue section, covered with a cover slip, incubated for 30 min in a light-protected humidified chamber at 37 °C, and then viewed with a inverted fluorescence microscope (NIKON Eclipse Ti-S, $\times 40$ objective) using the same imaging settings in the untreated and lead-treated rats. Fluorescence was detected with a 568-nm long-pass filter. For quantification, eight frozen tissue segments per animal were sampled for each experimental condition and averaged. The mean fluorescence densities in the target region were calculated.

Statistical analyses. All values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Contractile responses to phenylephrine were expressed as a percentage of the maximal response induced by 75 mM KCl. Vasodilator responses to ACh or SNP were expressed as the percentage of relaxation of the previous contraction.

For each concentration–response curve, the maximal effect (R_{max}) and the concentration of agonist that produced 50% of the maximal response (EC_{50}) were calculated using non-linear regression analysis (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The sensitivities of the agonists were expressed as pD_2 ($-\log EC_{50}$). To compare the effects of L-NAME, TEA, 4-AP, IbTX, ChTX and apamin on the relaxation responses to ACh, some results were expressed as the differences in the area under the concentration–response curves (dAUC) for the control and experimental groups. These values indicate whether the magnitude of the effect of L-NAME, TEA, 4-AP, IbTX, ChTX and apamin is different in the untreated or lead-treated rats.

The results were expressed as the mean \pm SEM of the number of rats indicated (n). The differences were analyzed using Student's *t*-test or two-way ANOVA followed by a Bonferroni test. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Drugs and reagents. Lead acetate, L-phenylephrine hydrochloride, ACh chloride, SNP, sodium pentobarbital, apocynin, SOD, catalase, OUA, L-NAME, TEA, 4-AP, IbTX, ChTX and apamin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The salts and reagents used were of analytical grade from Sigma-Aldrich and Merck (Darmstadt, Germany).

Results

Effects of lead treatment on vascular reactivity

Lead exposure did not affect the response to KCl (untreated E^+ : 3.46 ± 0.04 g, $n = 38$; lead-treated E^+ : 3.43 ± 0.11 g, $n = 40$; untreated E^- : 3.49 ± 0.03 g, $n = 20$; lead-treated E^- : 3.43 ± 0.09 g, $n = 20$; $P > 0.05$). Pre-contraction to phenylephrine used before performing ACh and SNP relaxation curves was similar in the groups (untreated E^+ : 2.46 ± 0.05 g, $n = 10$; lead-treated E^+ : 2.63 ± 0.03 g, $n = 10$; untreated E^- : 2.55 ± 0.11 g, $n = 10$; lead-treated E^- : 2.57 ± 0.04 g, $n = 10$ $P > 0.05$). However, this metal reduced vascular reactivity to phenylephrine in the aortic rings (Table 1). However, lead did not change the relaxation induced by acetylcholine (Table 2) or the relaxation produced by SNP (Table 3).

Table 1
Effects of apocynin, SOD and catalase on the vascular response to phenylephrine (R_{max} and pD_2) in aortas from untreated and lead-treated rats.

	Untreated		Lead treated	
	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2
Control	81.80 ± 4.74	6.55 ± 0.10	66.22 ± 4.66^a	6.29 ± 0.06
Apocynin	82.15 ± 9.69	6.25 ± 0.15	$47.23 \pm 5.22^*$	6.15 ± 0.10
SOD	79.70 ± 3.71	6.32 ± 0.08	$51.19 \pm 5.32^*$	$6.07 \pm 0.06^*$
Control	94.12 ± 4.07	6.11 ± 0.10	78.18 ± 0.71^b	5.99 ± 0.12
Catalase	92.39 ± 3.73	5.93 ± 0.15	$66.61 \pm 1.53^*$	5.86 ± 0.10

The results are expressed as mean \pm SEM of the number of animals shown in Fig. 1. R_{max} , maximal effect (expressed as a percentage of the maximal response induced by 75 mM KCl); pD_2 , $-\log$ one-half R_{max} . $P < 0.05$ vs. untreated control rats (a) and lead-treated control rats (b). Note that apocynin and SOD incubation have one control and lead-treated control rats (*). Note that apocynin and SOD incubation have one control and lead-treated control rats (*). Note that apocynin and SOD incubation have one control and lead-treated control rats (*).

Effect of lead treatment on oxidative stress

The basal O_2^- production in the aortas from the lead-treated rats was greater than that from the controls (Fig. 1A). To investigate whether the vascular oxidative stress induced by lead treatment was involved in the observed alterations of vascular reactivity to phenylephrine, we used apocynin (0.3 nM), which is a NADPH oxidase inhibitor; SOD, (150 U/mL), which is a superoxide anion scavenger; and catalase (1000 U/mL), which is a hydrogen peroxide scavenger. These drugs reduced the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in the aortas from lead-treated rats but did not in the aortas from untreated rats (Figs. 1B–D and Table 1).

Effects of lead treatment on Na^+/K^+ -ATPase activity

We previously reported that lead treatment for 7 days increased the activity of the sodium pump and protein expression of the Na^+/K^+ -ATPase α -1 subunit in aortic rings from treated rats (Fiorim et al., 2011). After endothelium removal, the KCl-induced relaxation was reduced in the aortic rings from both groups (Fig. 2A), but this reduction was greater in the aortas from lead-treated rats. To investigate the involvement of NO in Na^+/K^+ -ATPase activity, we used L-NAME (100 μ M), a nonselective NOS inhibitor, and aminoguanidine (50 μ M), a selective iNOS inhibitor. After incubating the rings with L-NAME, the KCl-induced relaxation was reduced in the aortic rings from both groups (Fig. 2B), but this reduction was greater in the aortas from the treated group compared to the untreated rats. Incubation with aminoguanidine did not modify the relaxation induced by potassium in aortas from untreated rats but reduced the relaxation induced by potassium in lead-treated rats (Fig. 2C). Similarly, after incubation of the

Table 2
Effects of N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), tetraethylammonium (TEA), 4-aminopyridine (4-AP), ibuprofen (IbTX), apamin and charybdotoxin (ChTX) on the vascular responses to acetylcholine (R_{max} and pD_2) in phenylephrine contracted aortas from untreated and lead-treated rats.

	Untreated		Lead treated	
	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2
Control	99.91 ± 0.09	7.12 ± 0.13	99.80 ± 0.10	7.11 ± 0.09
L-NAME	6.91 ± 3.51^a	7.14 ± 0.58	6.91 ± 2.86^a	7.11 ± 0.09
TEA	71.90 ± 2.47^b	6.62 ± 0.12^a	59.69 ± 3.16^b	$5.72 \pm 0.31^*$
4-AP	88.84 ± 3.03	6.45 ± 0.22^a	54.03 ± 2.46^b	6.72 ± 0.52
IbTX	94.14 ± 2.48^a	6.40 ± 0.18^a	81.43 ± 4.36^b	$6.44 \pm 0.18^*$
Apamin	91.65 ± 2.22^a	6.87 ± 0.09	91.47 ± 2.23^a	$6.45 \pm 0.07^*$
ChTX	92.01 ± 1.88^a	6.93 ± 0.08	90.41 ± 3.19^a	$6.42 \pm 0.13^*$

The results are expressed as mean \pm SEM of the number of animals shown in Figs. 2, 3, 4 and 5. R_{max} , maximal effect; pD_2 , $-\log$ one-half R_{max} . $P < 0.05$ vs. untreated control rats (a) and lead-treated control rats (b).

Table 3

Effects of 4-aminopyridine (4-AP) and ibetoxin (IBTX) on the vascular response to sodium nitroprusside (R_{max} and ED_{50}) in phenylephrine contracted aortas from untreated and lead-treated rats.

	Untreated		Lead treated	
	R_{max}	ED_{50}	R_{max}	ED_{50}
Control	99.90 ± 0.10	7.49 ± 0.07	99.96 ± 0.10	7.37 ± 0.06
IBTX	99.47 ± 0.83	6.35 ± 0.10*	91.50 ± 2.20*	6.57 ± 0.10*
4-AP	93.25 ± 2.04*	6.77 ± 0.17*	89.01 ± 2.39*	6.95 ± 0.16*

The results are expressed as mean ± SEM of the number of animals shown in Fig. 6. R_{max} , maximal effect; ED_{50} , log one-half R_{max} . * $P < 0.05$ vs. untreated control rats (*) and lead-treated control rats (*).

rings with OUA (100 μ M) plus L-NAME or aminoguanidine, the KCl-induced relaxation was reduced in aortic rings from treated rats but not in aortas from untreated rats (Figs. 2B and C). After endothelium removal, incubation with OUA, further reduced the KCl-induced relaxation in aortic rings from both groups (Fig. 2A), but this reduction was greater in aortas from lead-treated rats. These results reinforce the previous findings regarding the increase of NKA activity after lead treatment.

The K^+ channel blocker TEA (2 mM) did not modify the relaxation induced by potassium in aortas from untreated rats but reduced that relaxation in lead-treated rats. However, after incubation with OUA (100 μ M), the KCl-induced relaxation was not different compared to ouabain alone in either the treated or untreated rats (Fig. 2D).

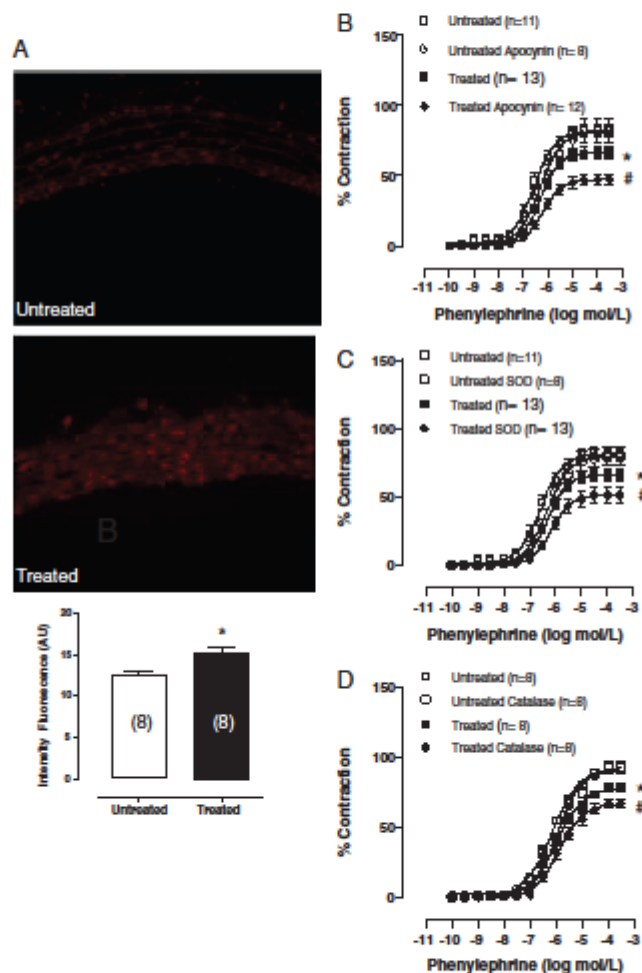


Fig. 1. Vascular superoxide anion production in segments of aorta from untreated and lead-treated rats. Representative fluorescent photomicrographs of inverted microscopic arterial sections labeled with the oxidative dye hydroethidine and vascular superoxide anion quantification (A). The effect of apocynin (0.3 μ M) (B), superoxide dismutase (SOD) (150 U/ml) (C) and catalase (1000 U/ml) (D) on the contraction-response curves to phenylephrine in aortic rings from untreated and lead-treated rats. The results are expressed as mean ± SEM. * $P < 0.05$ (untreated vs. treated); * $P < 0.05$ (treated apocynin or SOD or catalase vs. treated), Student's *t*-test. The number of animals is indicated in parentheses.

Author's personal copy

26

J. Florim et al. / Toxicology and Applied Pharmacology 262 (2012) 22–31

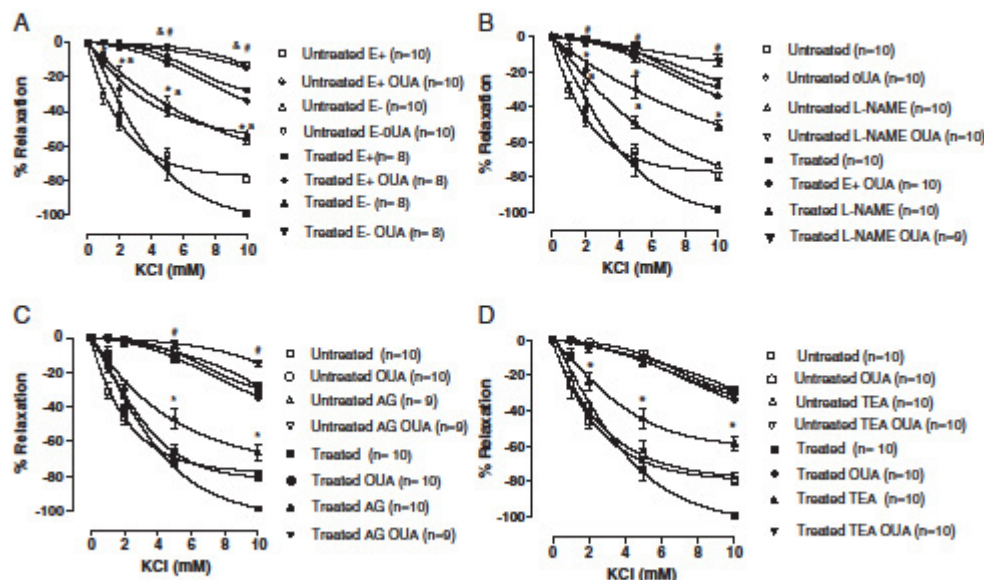


Fig. 2. The effects of endothelium removal (A), N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M) (B), aminoguanidine (AG, 50 μ M) (C) and TEA (2 mM) (D) on potassium-induced relaxation in the aortic rings from untreated and lead-treated rats previously incubated in a K^+ -free medium and contracted with phenylephrine before and after incubation with 100 μ M ouabain (OUA). The results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ (untreated E $^+$ or L-NAME vs. untreated E $^+$); * $P < 0.05$ (treated E $^+$ or L-NAME or AG or TEA vs. treated E $^+$); * $P < 0.05$ (untreated OUA E $^+$ vs. untreated OUA E $^+$); * $P < 0.05$ (treated OUA E $^+$ or L-NAME or AG vs. treated OUA E $^+$), all by two-way ANOVA followed by a Bonferroni test. The number of animals is indicated in parentheses.

Effects of lead treatment on the functional activity of potassium channels

As mentioned, the endothelium-dependent relaxation induced by ACh in arteries pre-contracted with phenylephrine was similar in aortic rings from untreated and lead-treated animals (Table 2). In arteries pre-contracted with 60 mmol/L KCl, the relaxation induced by ACh was reduced both in untreated (R_{max} for phenylephrine pre-contraction: $99.91 \pm 0.09\%$, $n = 10$; for KCl pre-contraction: $56.14 \pm 2.83\%$, $n = 10$, $P < 0.05$) and lead-treated rats (R_{max} for PHE pre-contraction: $99.99 \pm 0.01\%$, $n = 10$; for KCl pre-contraction: $25.97 \pm 3.29\%$, $n = 10$, $P < 0.05$). However, this reduction was much more marked in arteries obtained from lead-treated rats (Fig. 3A). The participation of NO in ACh-induced relaxation was investigated using L-NAME (100 μ M), which was added before phenylephrine or high K^+ . Under these conditions, the relaxation induced by ACh was negligible in arteries from both groups contracted with either phenylephrine (Fig. 3B) or KCl (Fig. 3C), indicating that NO accounted for most of the endothelium-dependent relaxation. However, the greater reduction in ACh relaxation observed in arteries from lead-treated rats pre-contracted with KCl compared to untreated rats suggests a different contribution of hyperpolarizing mechanisms in the aortas from both groups. Therefore, we tested the effects of some potassium channel blockers on the basal tone and relaxation induced by ACh.

TEA (2 mM), a nonselective K^+ channel blocker, and 4-AP (5 mM), a specific inhibitor of K_v channels, increased the basal tone in aortic segments from both groups, but these effects were greater in the lead-treated rats compared to the untreated rats (Fig. 4A), suggesting a relevant role for K_v channels in controlling arterial tone. In addition, TEA and 4-AP reduced the relaxation induced by ACh in aortic segments from both groups (Figs. 4B, D and Table 2), and this effect was greater in preparations from lead-treated rats compared to untreated rats as shown by the dAUC values (Figs. 4C and E).

To evaluate the role of K_{Ca} channels, the aortic rings were incubated with the selective BK_{Ca} blocker (IBTX), the selective SK_{Ca} blocker (apamin) and the K_{Ca} and K_v blocker (ChTX). Only iberiotoxin increased the basal tone in aortic segments from the lead-treated and untreated rats, but this effect was similar in both groups (Fig. 4A). Moreover, the three calcium-activated potassium channel inhibitors reduced the relaxation induced by ACh in aortic segments from both groups (Figs. 5A, C, E and Table 2). However, this effect was greater in preparations from lead-treated than untreated rats as shown by the dAUC values (Figs. 5B, D and F).

Because lead treatment increases the contribution of K_v and K_{Ca} channels upon ACh-induced relaxation, which is mainly mediated by NO, we analyzed the participation of these K^+ channels in the relaxation induced by the NO donor, SNP. The endothelium-independent relaxation induced by SNP in arteries pre-contracted with phenylephrine was similar in aortic rings from untreated and lead-treated animals (Table 3). After IBTX and 4-AP incubation, there was a decrease in the relaxation induced by SNP in aortic segments from either group (Figs. 6A, C and Table 3), and this decrease was greater in preparations from lead-treated than untreated rats, as shown by the dAUC values (Figs. 6B and D). Endothelium removal did not affect SNP relaxation in any group, being the relaxation induced by the NO donor similar between groups (Fig. 6E).

Discussion

The results presented here show that a 7-day treatment with a low concentration of lead acetate increased free radicals production, despite the reduction in vascular reactivity to phenylephrine, but did not change the relaxation induced by ACh and SNP. On the other hand, our findings also suggest that activation of the K^+ channel as well as the increased Na^+/K^+ ATPase activity masked a putative endothelial

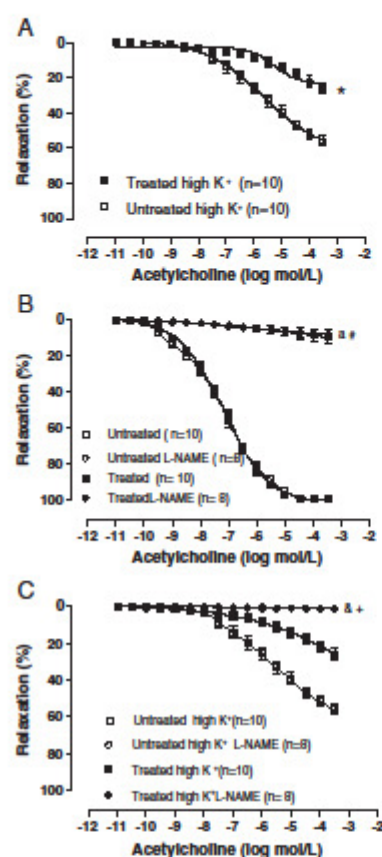


Fig. 3. Concentration-response curves to acetylcholine (ACh) in aortic rings from untreated and lead-treated rats precontracted with 60 mmol/L KCl (A and C) or phenylephrine (B) in the absence or presence (B and C) of L-NAME (100 μ M). The results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ (untreated high K^+ vs. treated high K^+); $^{**}P < 0.05$ (untreated L-NAME vs. untreated); $^{***}P < 0.05$ (treated L-NAME vs. treated); $^{****}P < 0.05$ (untreated high K^+ L-NAME vs. untreated high K^+); $^{*****}P < 0.05$ (treated high K^+ L-NAME vs. treated high K^+). Student's t -test. The number of animals is indicated in parentheses.

dysfunction in lead-treated rats induced by the increased oxidative stress.

Lead has been identified as a hazard and risk factor for developing cardiovascular diseases (Navas-Acien et al., 2007). The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) considers the reference blood lead concentration level to be 60 μ g/dL (ATSDR, 2005; Kosnett et al., 2007; Patrick, 2006). Several studies have supported the association between high blood lead levels and hypertension (Glenn et al., 2006; Harlan, 1988; Navas-Acien et al., 2007). In a recent study, using controlled lead administration, we found a blood lead concentration of 9.98 μ g/dL after a 7-day treatment with a low dose of lead acetate (Fiorim et al., 2011). Although this value was below the blood lead reference, it was sufficient to increase SBP and to decrease the contractile responses induced by phenylephrine in the rat aorta. In accordance, a blood lead concentration of 37 μ g/dL (below the blood lead reference) that was reached after acute administration also induced an increase in SBP (Simões et al., 2011). Thus, these results provide guidance for revising the lead concentrations considered to be safe.

Several studies have shown that lead exposure in animals or humans induces the generation of ROS with subsequent oxidative damage to several organs and systems and also alters antioxidant defense systems (Ding et al., 1998; Farmand et al., 2005; Ni et al., 2004; Vaziri et al., 1999b). Similarly, we observed increased superoxide anion production in the aorta from lead-treated rats. In addition, the inhibition of NADPH oxidase as well as SOD and catalase reduced the vasoconstrictor response induced by phenylephrine only in the aortas from lead-treated rats, suggesting that both superoxide anion production and hydrogen peroxide are involved in the vascular alterations promoted by lead. In agreement, Silveira et al. (2010) demonstrated the involvement of free radicals after acute administration of lead acetate in the tail vascular bed reactivity. Ni et al. (2004) showed that lead exposure increased superoxide and hydrogen peroxide production in coronary endothelial cells.

Despite the involvement of ROS in this experimental model, which could increase vasoconstriction, we previously observed a decrease in vascular reactivity to phenylephrine in the aortas from lead-treated rats and an increase in the modulator effects by NO (Fiorim et al., 2011). Other investigators have also demonstrated that incubation with 1 ppm lead acetate for 24 h increases NO production in endothelial cells from human coronary arteries (Vaziri and Ding, 2001). Furthermore, several reports have suggested that lead exposure increases the expression of iNOS in aorta (Vaziri et al., 1999a, 1999b, 2001; Fiorim et al., 2011), heart (Vaziri et al., 2001) and kidney (Gonick et al., 1997; Vaziri et al., 2001). NO produces vasodilation of the vascular smooth muscle cells in all types of blood vessels, especially in conductance arteries. Moreover, NO could also stimulate Na^+/K^+ -ATPase activity (Gupta et al., 1994) and open K^+ channels (Bolotina et al., 1994; Félétou and Vanhoutte, 2006, 2009), which contribute to reduced vascular tone.

The activation of Na^+/K^+ -ATPase activity is an important mechanism contributing to the maintenance of vascular tone and membrane potential in vascular smooth muscle cells (Blaustein, 1993; Marín and Redondo, 1999). We previously reported that a 7-day treatment with a low concentration of lead acetate increased the protein expression of the Na^+/K^+ -ATPase α -1 subunit and Na^+/K^+ -ATPase activity in the rat aorta (Fiorim et al., 2011). K^+ -induced relaxation was used as an index of Na^+/K^+ -ATPase functional activity (Weeb and Bohr, 1978). Endothelium removal and the non specific NOS inhibitor L-NAME reduced such relaxation more in aortic rings from lead-treated compared to the untreated rats, and the iNOS inhibitor aminoguanidine only had effect in rings from treated rats. These findings suggest that the increased of Na^+/K^+ -ATPase functional activity induced by lead could be mediated by the NO pathway.

In addition to guanylate cyclase activation, NO is also a hyperpolarizing factor that increases K^+ channel permeability (Bolotina et al., 1994; Félétou and Vanhoutte, 2006). Our results showed that the non specific K^+ channels blocker TEA did not modify K^+ -induced relaxation in the aortas from untreated rats but reduced it in treated rats. After co-incubation of the rings with TEA plus OUA, K^+ -induced relaxation was not different between the groups, suggesting a similar action between K^+ channels and Na^+/K^+ -ATPase activity in the lead-treated rats.

Lead treatment did not modify ACh-induced relaxation in phenylephrine pre-contracted aortas, as previously reported (Fiorim et al., 2011). The importance of endothelial NO in controlling vascular tone in conductance arteries is well established (Urakami-Harasawa et al., 1997; Félétou and Vanhoutte, 2006). In agreement, we found that ACh-induced relaxation in the aorta was entirely dependent on NO release because it was abolished by L-NAME. As mentioned, NO can also hyperpolarize vascular smooth muscle cells by activating different K^+ channels, depending on the vascular bed or species studied (Bolotina et al., 1994; Félétou and Vanhoutte, 2006, 2009; Félétou et al., 2010). ACh induced-relaxation was partially blocked by high K^+ concentration suggesting that it is mediated, in part, by K^+ channels

Author's personal copy

28

J. Fiorim et al. / Toxicology and Applied Pharmacology 262 (2012) 22–31

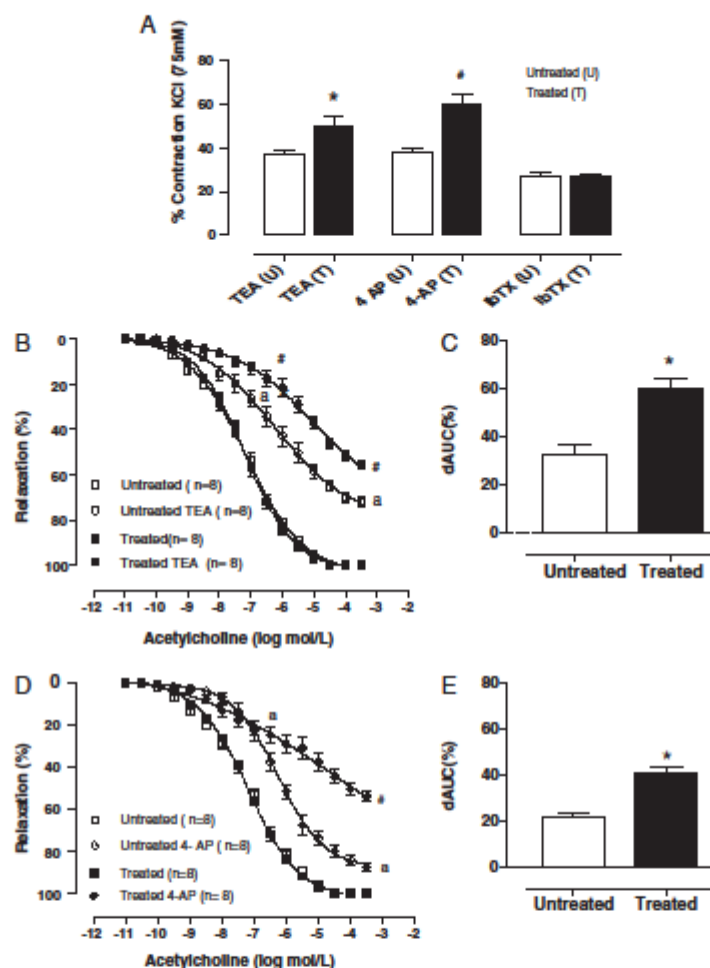


Fig. 4. The contractile effect induced by TEA (2 mM), 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM) and ibuprofen (bTX, 30 mM) in aortas from untreated and lead-treated rats (A). The results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. untreated TEA and * $P < 0.05$ vs. untreated 4-AP, Student's *t*-test. The effect of TEA (2 mM) (B) and 4-AP, (5 mM) (D) on the concentration-response curves to acetylcholine (ACh) in endothelium-intact aortic segments from untreated and lead-treated rats. The inset shows differences in dAUC in the absence and presence of TEA (C) or 4-AP (E). * $P < 0.05$ (untreated TEA or 4-AP vs. untreated); * $P < 0.05$ (treated TEA or 4-AP vs. treated); * $P < 0.05$ (untreated vs. treated dAUC), all by Student's *t*-test. The number of animals is indicated in parentheses.

activation. However, this reduction was much more marked in arteries obtained from lead-treated rats. The residual relaxation to ACh in high-KCl precontracted vessels was abolished by L-NAME indicating an additional effect of NO, independent of K^+ channel activation, on ACh-induced relaxation.

TEA was initially used to evaluate the overall contribution of K^+ channels to the basal tone and ACh-induced relaxation. TEA increased basal tone more in preparations from the lead-treated rats compared to the untreated rats and reduced the relaxation induced by ACh more in aortic segments from the lead-treated than untreated group; these results suggest a greater contribution of K^+ channels in both basal tone and ACh-induced relaxation after lead treatment. Accordingly, Fiorim et al. (2011) observed that TEA potentiated the phenylephrine

response more strongly in aortic rings from lead-treated rats compared to untreated rats. In addition, patch clamp observations of K^+ currents in human erythrocytes showed that lead exposure activates K^+ channels (Kempe et al., 2005).

Different K^+ channels are involved in cardiovascular disorders, such as atherosclerosis, hypertension and stroke (Nelson and Quayle, 1995; Callera et al., 2004; Ledoux et al., 2006). Lead treatment increased NO bioavailability in the rat aorta (Fiorim et al., 2011) and as mentioned NO could open K^+ channels. Therefore, we investigated the participation of diverse K^+ channels in regulating basal tone and in NO-mediated ACh-induced relaxation in lead-treated rats. It has been shown that aortic tone is strongly dependent on the activity of K_v channels (Tammaro et al., 2004). In addition, Cheong et al. (2002) also has

Author's personal copy

J. Florim et al. / Toxicology and Applied Pharmacology 262 (2012) 22–31

29

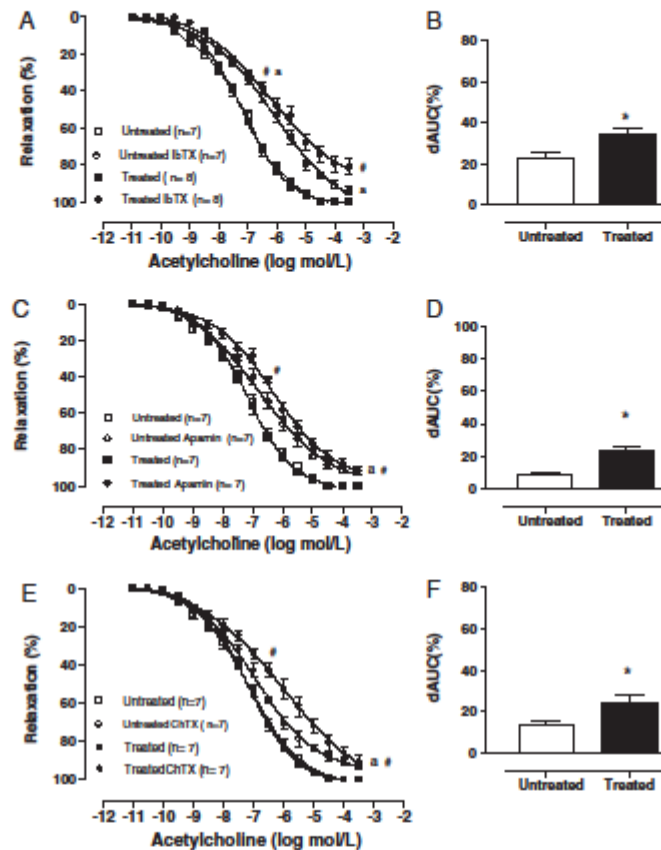


Fig. 5. The effect of iberiotoxin (IbTX, 30 nM) (A), apamin (0.5 μM) (C) and charybdotoxin (ChTX, 0.1 μM) (E) on the concentration–response curve to acetylcholine (ACh) in aortic rings from untreated and lead-treated rats. The inset shows differences of area under the concentration–response curves (dAUC) in the absence and presence of IbTX (B), apamin (D) or ChTX (F). The results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ (untreated IbTX or apamin or ChTX vs. untreated); * $P < 0.05$ (treated IbTX or apamin or ChTX vs. treated); * $P < 0.05$ (untreated vs. treated % dAUC), Student's *t*-test. The number of animals is indicated in parentheses.

shown the participation of K_v channel currents in small blood vessels. Our results showed that 4-aminopyridine, a selective inhibitor of K_v channel, induced a greater increase in basal tone in aortic segments from lead-treated than in untreated rats. Furthermore, this inhibitor reduced the relaxation induced by ACh to a greater extent in preparations from lead-treated compared to untreated rats. These results suggest that K_v channels contribute to the regulation vascular tone in the rat aorta and that channels contribute more to the basal tone and ACh-induced relaxation in the lead-treated rats.

Several studies have shown that BK_{Ca} plays a key role in regulating vascular tone in different beds (Cheong et al., 2002; Eichhorn and Dobrev, 2007; Briones et al., 2009), and the activation of these channels is an important component of the EDHF response in several vascular beds (Ledoux et al., 2006). Our results show that both charybdotoxin (K_{Ca} and K_v blocker) and apamin (selective SK_{Ca} blocker) did not modify basal tone in aortic segments from both groups. However, iberiotoxin increased the basal tone in the same way in aortic segments from untreated and lead-treated rats suggesting that BK_{Ca} similarly contributes

to the basal tone in the rat aorta. Similar results were reported by Briones et al. (2009) in coronary arteries from ouabain treated and untreated rats. Regarding the involvement of calcium-activated K^+ channels on ACh-induced relaxation, our results showed that ChTX, IbTX and apamin reduced the relaxation induced by ACh to a greater extent in the lead-treated than in the untreated group, suggesting that lead treatment increases the participation of K_{Ca} , BK_{Ca} and SK_{Ca} in the endothelium-dependent relaxation induced by ACh.

As mentioned before, the L-NAME effect on ACh relaxation indicates that NO is the main factor responsible for such relaxation in the aorta. Furthermore, it is known that BK_{Ca} and K_v channels are present in the vascular smooth muscle (Nelson and Quayle, 1995; Félétou and Vanhoutte, 2009). Similar to the results observed with ACh, the endothelium-independent relaxation induced by SNP was not affected by lead treatment. Importantly, after IbTX or 4-AP incubation, there was a greater decrease in the relaxation induced by SNP in aortic segments from the lead-treated rats compared to the untreated rats. These results suggest that both BK_{Ca} and K_v channels

Author's personal copy

30

J. Florim et al. / Toxicology and Applied Pharmacology 262 (2012) 22–31

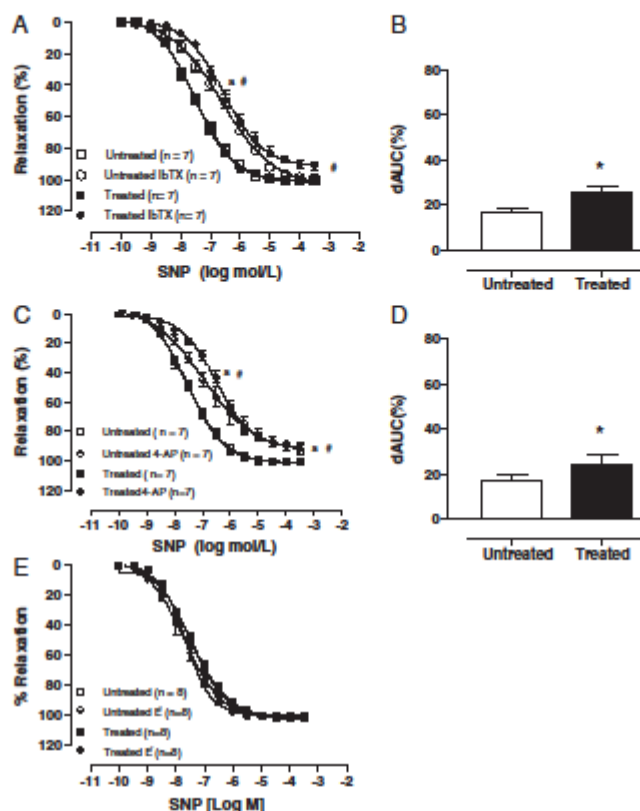


Fig. 6. The effect of ibetoxin (IBTX, 30 nM) (A), 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM) (C) and endothelium removal (E) on the concentration-response curves to sodium nitroprusside (SNP) in aortic rings from untreated and lead-treated rats. The inset shows differences of area under the concentration-response curves (dAUC) in the absence and presence of IBTX (B) or 4-AP (D). The results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ (untreated 4-AP vs. untreated); # $P < 0.05$ (treated IBTX or 4-AP vs. treated); * $P < 0.05$ (untreated vs. treated % dAUC), Student *t*-test. The number of animals is indicated in parentheses.

are involved in NO-induced relaxation and that these channels contribute to a greater extent in lead-treated rats. However, we cannot discard alterations in NO-derived cGMP-dependent mechanisms after lead treatment and more experiments would be necessary to clarify this issue.

In summary, our results show that a 7-day treatment with a low concentration of lead acetate increases free radical production, despite the reduction in vascular reactivity to phenylephrine and did not change the relaxation induced by ACh and SNP. Our results also suggest that the activation of K^+ channels and increased Na^+/K^+ ATPase activity mask putative endothelial dysfunction in lead-treated rats. Moreover, activation of K_v and BK_{Ca} channels seems to contribute more to the control of vascular tone in the aorta from lead-treated rats. Recently, using this experimental model, we showed that lead exposure increased NO bioavailability and reduced vascular tone (Florim et al., 2011). Our findings suggest that the activation of K^+ channels and Na^+/K^+ ATPase could reduce vascular tone in the initial stages of lead exposure that counteracts the vasoconstrictor action of free radicals. In fact, lead exposure, at low concentrations, could be considered an important cardiovascular risk factor and a serious problem for public health.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgments

This study was supported by the "Ministerio de Ciencia e Innovación" (SAF 2009-07201), "Ministerio de Educación, Cultura y Deporte" (PHB2011-0001-PC) and "Banco Santander-Central-Hispano" in Spain and by grants from the "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior" (CAPES), "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq), "Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo" (FAPES) and "Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia" (FUNCTEC – 39767531/07) in Brazil.

References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2005. Toxicological Profile for Lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.
- Blaustein, M.P., 1993. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am. J. Physiol.* 264, 1367–1387.

- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A., 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channel in vascular smooth muscle. *Nature* 368 (6474), 850–853.
- Briónes, A.M., Padilha, A.S., Cogolado, A.L., Alonso, M.J., Vassallo, D.V., Pérez-Vicario, F., Salas, M., 2003. Activation of Br_{Ca} channels by nitric oxide prevents coronary artery endothelial dysfunction in ouabain-induced hypertensive rats. *J. Hypertens.* 21, 83–91.
- Callera, G.E., Yagi, A., Torres, R.C., Rossoni, L.V., Bendhack, L.M., 2004. Ca^{2+} activated K^{+} channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 1036–1042.
- Chambers, A., Cattrone, J.D., 2008. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiological regulation. *Vascul. Pharmacol.* 49, 134–140.
- Cheong, A., Quinn, K., Dedman, A.M., Beech, D.J., 2002. Activation thresholds of K_{Ca} , Br_{Ca} and Cl_{Ca} channels in smooth muscle cells in pial pericyclic arterioles. *J. Vasc. Res.* 39, 122–130.
- Ding, Y., Vaziri, N.D., Gonick, H., 1998. Lead-induced hypertension. II response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase and nitroprusside. *Environ. Res.* 75, 107–113.
- Eckholm, R., Dubey, D., 2007. Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential. *Neurosci. Biomed. Res.* 37, 145–155.
- Farmard, F., Bidaud, A., Roberts, C.K., Sindhu, R.K., 2005. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ. Res.* 98, 33–39.
- Fénelon, M., 2009. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br. J. Pharmacol.* 156, 546–562.
- Fénelon, M., Vanhousme, P.M., 2005. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1215–1225.
- Fénelon, M., Vanhousme, P., 2009. EDHF: an update. *Clin. Sci.* 117, 139–155.
- Fénelon, M., Kishner, R., Vanhousme, P., 2010. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr. Hypertens. Rep.* 12, 267–275.
- Florim, J., Ribeiro Júnior, R.F., Silveira, E.A., Padilha, A.S., Vescovi, M.V., de Jesus, H.C., Stefanson, I., Salas, M., Vassallo, D.V., 2011. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aorta. *PLoS One* 6 (2), e17117.
- Förstermann, U., Münzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Circulation* 113, 1708–1714.
- Glen, S.B., Bandeen-Roche, K., Lee, B.K., Weaver, V.M., Todd, A.C., Schwartz, B.S., 2006. Changes in systolic blood pressure associated with lead in blood and bone. *Epidemiology* 17, 538–544.
- Gonick, H.C., Ding, Y., Bondy, S.C., Ni, Z., Vaziri, N.D., 1997. Lead induced hypertension. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension* 30 (5), 1487–1492.
- Gupta, S., McArthur, C., Goady, C., Ruderman, N.B., 1994. Stimulation of vascular Na^{+} - K^{+} -ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am. J. Physiol.* 266 (3), H2146–H2151.
- Harkin, W.R., 1988. The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environ. Health Perspect.* 78, 9–13.
- Kempe, A.S., Lang, P.A., Biele, K., Kluft, B.A., Wiedt, T., Huber, S.M., Dauter, C., Lang, F., 2005. Stimulation of erythrocyte phosphatidylinositol exposure by lead ions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C196–C202.
- Ko, E.A., Hsu, J., Jung, U.D., Park, W.S., 2008. Physiological roles of K^{+} channels in vascular smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.* 44 (2), 65–81.
- Konnet, M.J., Weiden, R.P., Forstner, S.J., Hipland, K.L., Materna, B.L., Schwartz, B.S., Hsu, H., Wiedt, A., 2007. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ. Health Perspect.* 115 (3), 463–471.
- Ledoux, J., Weimer, M.E., Brayden, J.E., Nelson, M.T., 2006. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 21, 60–76.
- Levin, S.M., Goldberg, M., 2000. Clinical evaluation and management of lead exposure construction workers. *Am. J. Ind. Med.* 37, 23–43.
- Marín, J., Redondo, J., 1999. Vascular sodium pump endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacol. Ther.* 84, 249–271.
- Navas-Acien, A., Guallar, E., Silbergeld, E.K., Rothberg, S.J., 2007. Lead exposure in cardiovascular disease – a systematic review. *Environ. Health Perspect.* 115, 472–482.
- Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268 (3), C799–C822.
- Ni, Z., Hou, S., Ramon, C.H., Vaziri, N.D., 2004. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 65, 2329–2336.
- Patrick, L., 2006. Lead toxicity, a review of the literature. Part I: exposure, evaluation, and treatment. *Altern. Med. Rev.* 11 (1), 2–22.
- Poreba, R., Poreba, M., Gó, P., Andziak, R., 2011. Ambulatory blood pressure monitoring and structural changes in carotid arteries in nonoccupational workers occupationally exposed to lead. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1174–1180.
- Rossoni, L.V., Salas, M., Marín, J., Vassallo, D.V., Alonso, M.J., 2002. Alterations in phenylephrine induced contractions and the vascular expression of Na^{+} , K^{+} -ATPase in ouabain-induced hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 135 (3), 771–781.
- Silveira, E.A., Lizaola, J.H.F., Souza, L.P., Stefanson, I., Vassallo, D.V., 2010. Acute lead-induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails in endothelium-dependent. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43 (5), 492–499.
- Sin, M.R., Ribeiro Júnior, R.F., Vescovi, M.A., de Jesus, H.C., Padilha, A.S., Stefanson, I., Vassallo, D.V., Salas, M., Florim, J., 2011. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. *PLoS One* 6 (4), e18730.
- Stander, S.B., Quayle, J.M., 1998. K^{+} channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.* 154, 549–557.
- Tamman, P., Smith, A.L., Hutchings, S.R., Smolov, S.V., 2004. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K^{+} channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 140, 303–317.
- Taggart, C.R., Hollenberg, M., Anderson, T.J., Ding, H., Jiang, Y., Coroni, L., Wehler, W.R., Ng, E.S., Biliq, A., Andrews, K., McGinnis, J.J., Panimelvan, M., 2003. The endothelium in health and disease – a target for therapeutic intervention. *J. Smooth Muscle Res.* 39 (6), 240–267.
- Ukrami-Haraszawa, L., Shimokawa, H., Nakashima, M., Egashira, K., Takeshita, A., 1997. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J. Clin. Invest.* 100, 2793–2799.
- Vassallo, D.V., Lebarth, E.C., Mosim, C.M., Wiggins, G.A., Stefanson, I., 2008. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41, 789–795.
- Vaziri, N.D., Ding, Y., 2001. Effects of lead on nitric oxide synthase expression on coronary endothelial cells: a role of superoxide. *Hypertension* 37 (2), 223–226.
- Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z., 1999a. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension* 34, 558–562.
- Vaziri, N.D., Liang, K., Ding, Y., 1999b. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* 55, 1402–1408.
- Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z., 2001. Compensatory up-regulation of nitric oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension: reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 679–685.
- Vaziri, N.D., Lin, C.Y., Farmard, F., Sindhu, R.K., 2003. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* 63, 186–194.
- Weib, R.C., Rohr, D.F., 1978. Potassium induced relaxation as an indicator of Na^{+}/K^{+} ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 15, 198–207.
- Weiler, E., Khalil-Manesh, F., Gonick, H.C., 1990. Effects of lead and a low molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin. Sci.* 79, 185–192.
- Wiggins, G.A., Pechan, F.M., Briónes, A.M., Pérez-Girón, J.V., Miguel, M., Vassallo, D.V., Cachofeiro, V., Alonso, M.J., Salas, M., 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295 (3), H1033–H1043.